

# LAR

## Large Animal Review

Indicizzato su CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH



ISSN: 1124-4593

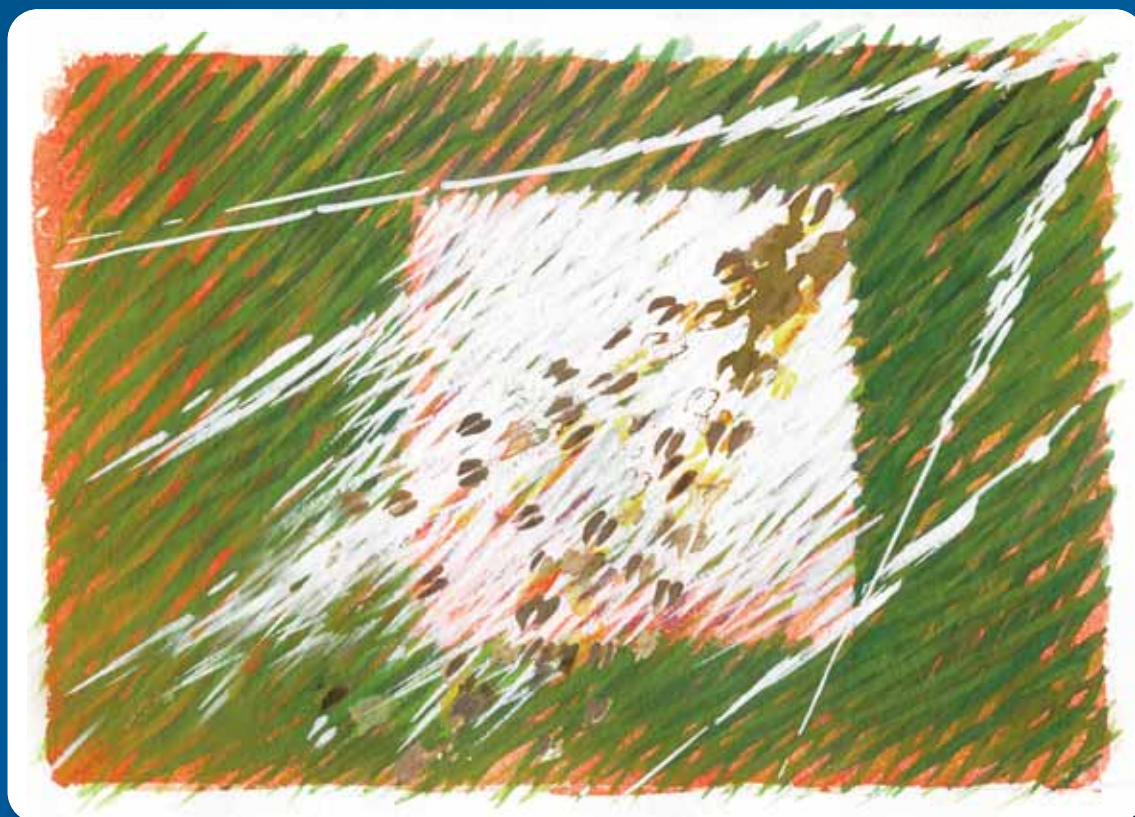
### **XIX CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.**

Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli ovini e dei caprini

**22/25 settembre 2010**

Baia Flaminia Resort - Pesaro

San Patrignano - Coriano (Rimini)



**Relazioni delle Tavole Rotonde**  
**Comunicazioni Scientifiche**  
**Poster**  
**Simposi Satellite**



Società Italiana Veterinari per Animali da Reddito  
Società Federata ANMVI

# TOSSINFEZIONI DEGLI OVINI, CAPRINI E BOVINI



**FULMINATI**



**PROTETTI**

# MILOXAN<sup>®</sup>

LA PROTEZIONE CONTRO LE TOSSINFEZIONI DEI RUMINANTI DOMESTICI

Vaccino inattivato e adiuvato  
contro le tossinfezioni  
da batteri anaerobi  
(*Cl. chauvoei*, *Cl. novyi*,  
*Cl. septicum*, *Cl. perfringens*,  
*Cl. sordellii*, *Cl. tetani*)



Merial Italia spa - Centro Direzionale Milanofiori - Strada 6, Palazzo E/5 - 20090 Assago (MI)  
Tel. 02.57.76.61 - Fax 02.57.766.301 - E-mail: [merial.italia@merial.com](mailto:merial.italia@merial.com) - [www.merial.com](http://www.merial.com)

® MILOXAN è un marchio di Merial. © Copyright 2002. Tutti i diritti riservati.







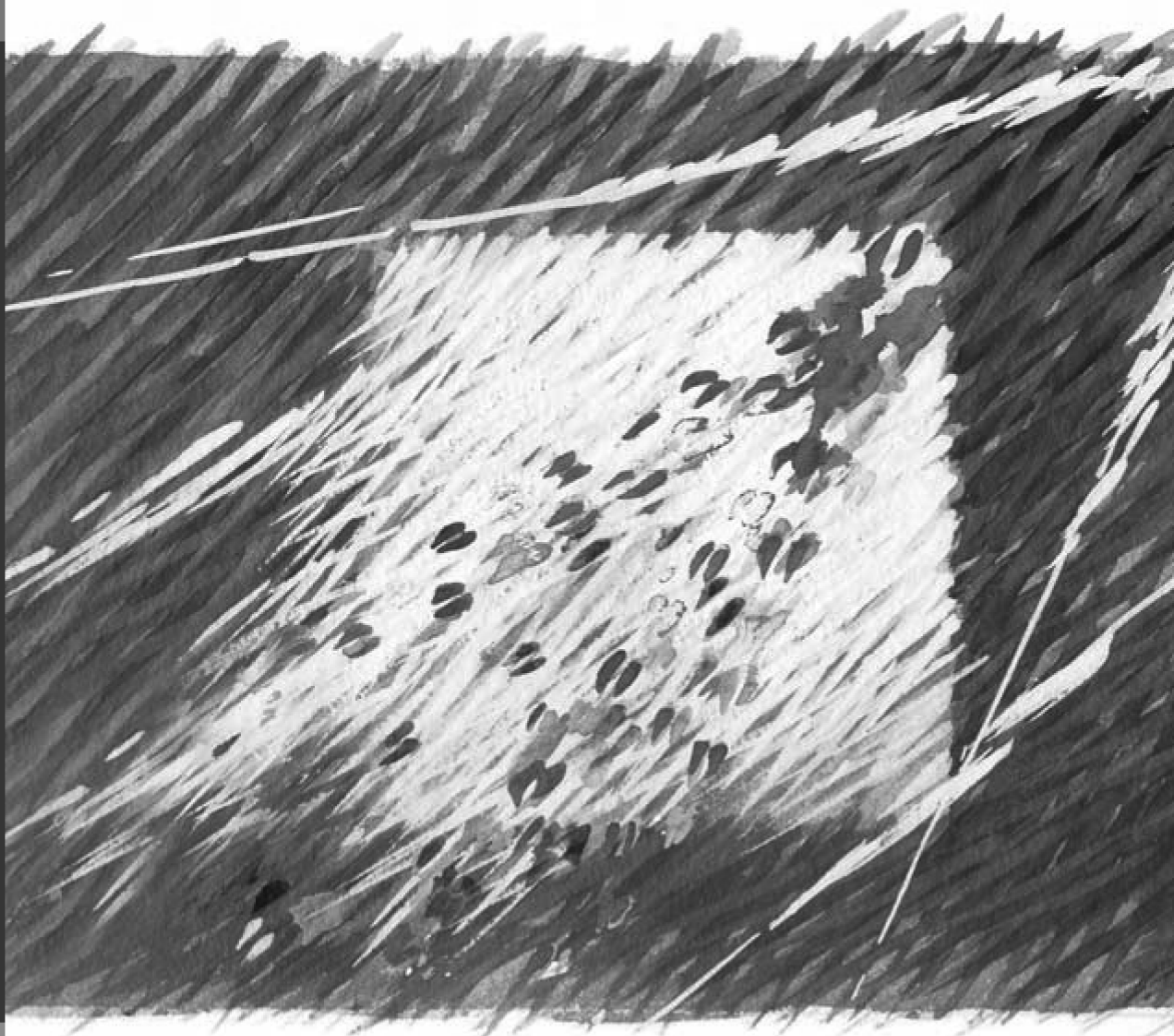
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
dell'Umbria e delle Marche



Società Italiana di Patologia ed  
Allevamento degli ovini e dei caprini

# XIX CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.

Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli ovini e dei caprini



**22/25 settembre 2010**

**Baia Flaminia Resort - Pesaro  
San Patrignano - Coriano (Rimini)**

Relazioni delle Tavole Rotonde • Comunicazioni Scientifiche  
Poster • Simposi satellite



# Voi controllate il vostro gregge, **FATRO lo protegge.**

*Vaccini allestiti  
con ceppi isolati  
ed interamente sviluppati  
e sperimentati in Italia.*

**FATRO / LINEA VACCINI OVINI**

## **CLOSTRIVAX®**

Vaccino inattivato contro  
le **clostridiosi** di ovini e bovini



## **OVAX®-AGALASSIA**

Vaccino inattivato contro  
l'**agalassia contagiosa** degli ovini



## **OVAX®-CLAMIDIA**

Vaccino inattivato contro  
l'**aborto enzootico** degli ovini



## **OVAX®-M.G.S.**

Vaccino inattivato contro la  
**mastite gangrenosa stafilococcica**  
degli ovini



info prodotti:  
**www.fatro.it**

**FATRO** - industria farmaceutica veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO)  
Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512728 - [www.fatro.it](http://www.fatro.it) - [e.mail:info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)





## **COMITATO ORGANIZZATORE**

### **Presidente**

*Silvano Severini*

### **Membri**

*Giovanni Filippini, Giovanni Pezzotti  
Francesco Tonucci, Paolo Coli  
Giancarlo Villa, Roberto Tomarelli  
Roberto Gatto, Cristina Martellini  
Giannalberto Luzi, Francesca Clementi  
Carlo Renieri, Massimo Trabalza Marinucci  
Emilia Duranti, Mariano Pauselli  
Emilio Spada, Bruno Ronchi  
Francesco Caverni, Luigi Draghi  
Maria Balsamo*

## **COMITATO SCIENTIFICO**

*Telemaco Cenci, Giovanni Garippa  
Remo Rosati, Vincenzo Grelloni  
Chiara Magistrali, Paola Papa  
Massimo Biagetti, Francesco Feliziani  
Monica Cagiola, Andrea Valiani  
Antonello Carta, Franco Moriconi  
Giovanni Vitellozzi, Elvio Lepri  
Anna Caroli, Guido Bufano  
Santo Caracappa, Giuseppe Cringoli  
Floro De Nardo, Guido Leori  
Giuseppe Moniello*

## **CONSIGLIO DIRETTIVO SIPAOC**

### **Presidente**

*Giovanni Garippa*

### **Vice Presidente**

*Guido Bufano*

### **Tesoriere**

*Antonello Carta*

### **Consiglieri**

*Anna Caroli, Giuseppe Cringoli, Floro De Nardo,  
Giovanni Filippini, Guido Leori, Bruno Ronchi*

### **Segretario**

*Giuseppe Moniello*

## **SEGRETERIE DEL CONGRESSO**

### **Segreteria Scientifica**

*Maria Paola Torlone, Sonia Fiorucci  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
dell'Umbria e delle Marche  
Via G. Salvemini, 1 - 06126 Perugia  
Tel. 075 343257 - Fax 075 343290  
e-mail: formazione@izsum.it*

### **Segreteria Organizzativa**

*Kassiopea Group srl  
Via G. Mameli, 65 - 09124 Cagliari  
Tel. 070 651242 - Fax 070 656263  
e-mail: domizianamessina@kassiopeagroup.com  
www.kassiopeagroup.com*

### **Si ringraziano:**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria  
e delle Marche  
Ministero della Salute  
Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali  
Regione Marche  
Provincia di Pesaro e Urbino  
Comunità di San Patrignano*

### **Con il contributo di:**

*Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali  
Regione Marche  
TreValli Cooperlat  
Federazione Provinciale Coldiretti Pesaro e Urbino  
Bayer - Ceva Vetem - Demas  
Fatro - Foss - Id-Vet  
Illumina Italy - Intervet Italia  
Merial Italia - Nuova Veterinaria  
Pfizer Animal Health  
Qiagen - Virbac*



La SIPAOC organizza quest'anno il Congresso Nazionale nelle Marche, in Provincia di Pesaro-Urbino.

Questo evento è stato fortemente voluto dalla Direzione Generale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche come importante momento di scambio tecnico scientifico ma anche come occasione privilegiata per la presentazione e la valorizzazione di uno splendido territorio e delle sue produzioni.

La scelta di ospitare il XIX Congresso SIPAOC si pone in una fase storica ed economica che vede il settore dei piccoli ruminanti in particolare difficoltà; l'inevitabile e progressiva contrazione del numero di aziende zootecniche dedite a questa forma di allevamento che si registra da anni, oltre che riflessi diretti sull'occupazione, comporta conseguenze sulla salvaguardia di una gamma di produzioni tipiche, fortemente radicate sul territorio e legate alla tradizione locale (basti pensare al formaggio di Fossa e alla Caciotta d'Urbino).

Queste produzioni rappresentano da sempre un elemento caratterizzante delle Marche e, tra gli altri fattori, esercitano un sensibile richiamo in termini promozionali e turistici, verso un territorio che fa della genuinità delle produzioni e della conservazione del paesaggio, un elemento portante.

La riduzione progressiva delle aziende dedite alla ovinicoltura, comporta inoltre dei rischi in termini di conservazione del patrimonio genetico di razze "minori" (vedi ad esempio Sopravissana e Fabrianese), che presentano caratteristiche di particolare adattamento al territorio di origine.

Alle difficoltà economiche si legano anche situazioni sanitarie particolarmente significative (si consideri ad esempio la presenza di molteplici focolai di Scrapie) che incidono ulteriormente su una condizione di precarietà economica degli allevamenti e richiedono, pertanto, una sorveglianza permanente ed un'efficace e tempestiva capacità di risposta da parte del mondo tecnico-scientifico.

Prendendo spunto da questo contesto socio-economico, la SIPAOC, nell'occasione del Congresso, intende porre l'accento su tutto il ventaglio di problematiche che investono il settore ovi-caprino (sanitarie, produttive ed ambientali), nel tentativo di stimolare l'attenzione verso un ambito produttivo che, da tempo, rappresenta un po' la "Cenerentola" della zootecnia in Italia.

Obiettivo principale del Congresso sarà quindi la definizione di strategie di intervento per una riqualificazione del settore, che può svolgere un ruolo essenziale nell'ambito della produzione agro-alimentare, zootecnica, turistica e di salvaguardia ambientale.

Pesaro, settembre 2010

*Il Presidente del Comitato Organizzatore  
Dott. Silvano Severini*



**Tavola rotonda:**  
**Le patologie causate dai retrovirus**  
**negli allevamenti ovini e caprini:**  
**le nuove prospettive del settore della ricerca**  
**e le esperienze maturate nei piani di controllo**

Studio della prevalenza del complesso CAEV-MV negli allevamenti ovi-caprini di alcune Regioni italiane F. FELIZIANI, E. STANGHELLINI, M.G. RANALLI, M. GIAMMARIOLI, M. GUIDONI, G. PERUGINI, N. PONTI, G. PURPARI, I. RICCI, S. ROSATI. ....	2
Il piano volontario di eradicazione dalla C.A.E.V. nella comunità montana "Langa Astigiana - Val Bormida" A. QUASSO. ....	4
Recenti acquisizioni in tema di lentivirus dei piccoli ruminanti S. ROSATI. ....	11

**Tavola rotonda:**  
**Innovazioni nel campo della genetica**  
**molecolare e nuovi approcci metodologici:**  
**prospettive per il miglioramento genetico**  
**dei piccoli ruminanti**

Il progetto SelMol: risultati nelle specie ovina e caprina L. RAMUNNO, A. CARTA, P. CREPALDI, L. FONTANESI, F. PANELLA, F. PILLA, A. NARDONE. ....	14
Utilizzo degli OVINE SNP50 BEADCHIP: esperienze applicative e prospettive per il miglioramento genetico M.G. USAI, T. SECHI, SARA CASU, A. CARTA. ....	17

**Tavola rotonda:**  
**Nuovi approcci nel controllo delle parassitosi**  
**degli ovini e dei caprini**

Nuove strategie per il controllo degli Strongili Gastrointestinali G. CRINGOLI. ....	22
Il controllo degli endoparassiti negli allevamenti caprini in Lombardia: tra strategie convenzionali ed alternative M.T. MANFREDI, S. ZANZANI, G. BRUNI, K. STRADIOTTO, G. ZANATTA, M. VILLA. ....	23
Valutazione dell'impatto sanitario e zootecnico dell'estrosi ovina A. SCALA, G. GARIPPA. ....	28

Malattie trasmesse da zecche in ovini e caprini: aspetti clinici e diagnostici A. TORINA, S. CARACAPPA. ....	31
---	----

**Tavola rotonda:**  
**Prospettive di sviluppo dell'allevamento**  
**degli animali da fibra**

La filiera tessile per lo sviluppo dei territori M. ANTONINI. ....	34
La fibra animale: una risorsa naturale ed il risultato dello studio nella complessità biologica per una applicazione pratica H. GALBRAITH. ....	35
Industria tessile e materie prime N. THOMPSON. ....	36

**Tavola rotonda:**  
**Vaccini e Vaccinazioni: recenti acquisizioni**  
**nel settore ovino e caprino**

Tipizzazione molecolare di ceppi di <i>Staphylococcus aureus</i> isolati da latte ovino A. DE GIUSEPPE. ....	38
Caratterizzazione molecolare dei principali clostridi responsabili di quadri patologici nei piccoli ruminanti A. FASANELLA. ....	39
La tossinotipizzazione di ceppi di <i>Clostridium perfringens</i> ai fini della vaccinazione G. SEVERI. ....	40

**Tavola rotonda:**  
**Alimenti funzionali: quali opportunità**

I formaggi ovini e caprini: una fonte di acidi grassi funzionali M. MELE. ....	42
Gli alimenti funzionali ed il loro rapporto con la salute dell'uomo M. ROSELLI. ....	46
I probiotici per la valorizzazione dei prodotti caseari tradizionali M.C. VERDENELLI. ....	49



## Comunicazioni scientifiche

Risposta immunitaria e dieta integrata con lino estruso  
in ovini da latte nel periparto

G. ACUTI, M. PELA, A. ANTOLINI, M. CAGIOLA,  
M. TRABALZA-MARINUCCI, L. MUGHETTI, L. MOSCATI. . . . . 52

Assenza degli alleli protettivi per la scrapie AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub>  
nelle razze ovine piemontesi

P.L. ACUTIS, S. COLUSSI, M.V. RIINA, T. GIOVANNINI,  
S. TRISORIO, M.G. MANIACI, F. ZUCCON, S. PELETTI . . . . . 53

Isolamento di *Pithomyces chartarum* da ovini  
con eczema facciale allevati in Italia

F. AGNETTI, M. GARAGUSO, G. PRESTERA, E. MANUALI,  
M. RODOLFI, E. LEPRI, F. TONUCCI, G. FILIPPINI . . . . . 54

Valutazione preliminare dell'infestazione da nematodi  
gastrointestinali in due razze caprine allevate in Lombardia

E.G. ALBERTI, I.L. ARCHETTI, M.T. MANFREDI, S. ZANZANI,  
G. BRUNI, G. ZANATTA . . . . . 55

Benessere animale nei caprini: studio di alcuni parametri  
immunitari nelle fasi di mungitura

L. ALFIERI, A. FAGIOLO, C. RONCORONI, A. DAL PRA', O. LAI . . . . . 56

Differenza nell'epidemiologia della scrapie atipica e classica  
in Italia

M.C. BONA, C. MAURELLA, G. RU . . . . . 57

Integrazione con granelle di leguminose per la produzione  
di latte ovino biologico

A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, G. TORNAMBÈ, V. BELLINA,  
F. MAZZA, M.L. ALICATA . . . . . 58

Efficacia dell'ivermectina verso nematodi gastrointestinali  
in allevamenti ovini e caprini in Campania

A. BOSCO, D. PINTUS, L. RINALDI, A. SANTANIELLO,  
M. SANTANIELLO, I. GUARIGLIA, G. COLES, G. CRINGOLI . . . . . 59

Curve di emissione del latte e stato sanitario della mammella  
in capre di razza Alpina

C. BOSELLI, G. GIANCOLINI, F. FILIPPETTI, S. AMATISTE . . . . . 60

La valutazione del rapporto uomo-animale nella specie ovina

A. BRAGHIERI, M. SCAVONE, A. M. RIVIEZZI, A. GIROLAMI,  
F. NAPOLITANO . . . . . 61

Integrazione della dieta di pecore da latte con lino estruso:  
effetti sulle caratteristiche chimiche e sensoriali del formaggio

R. BRANCIARI, A. VALIANI, L. MUGHETTI, D. MIRAGLIA,  
D. RANUCCI, G. ACUTI, S. ESPOSTO, M. TRABALZA-MARINUCCI . . . . . 62

Elettroforesi bidimensionale del proteoma  
di *Streptococcus uberis* per l'identificazione di biomarcatori  
diagnostici nelle mastiti ovine

F. CAMPESI, G. MAROGNA, G. SCHIANCHI, S. UZZAU, G.S. LEORI . . . . . 63

Aspetti della produzione dei piccoli ruminanti con impatto  
sulla salute umana

A. CAROLI, S. CHESSA, D. RIGNANESE, M. MARTINI, F. SALARI,  
I. ALTOMONTE, C. CASOLI, M. PAUSELLI, M.L. ALICATA, A. BONANNO,  
G. GARRO, R. MAURIELLO, L. CHIANESE, P. SACCHI . . . . . 64

Effetto del trattamento del favino su degradabilità  
ruminale e FAN

E. CESTOLA, L. MUGHETTI, G. ACUTI, M. TRABALZA-MARINUCCI,  
S. DE VINCENZI . . . . . 65

Analisi delle varianti genetiche di beta-caseina in razze ovine  
italiane

S. CHESSA, D. RIGNANESE, G. CERIOTTI, A. CAROLI . . . . . 66

Resistenza genetica ai lentivirus: studio sulla variabilità del gene  
*CCR5* nei caprini

S. COLUSSI, M.G. MANIACI, S. PELETTI, T. GIOVANNINI,  
P. MODESTO, A. QUASSO, P. SACCHI, S. ROSATI, P.L. ACUTIS . . . . . 67

Proteolisi e lipolisi in formaggi ottenuti da latte di pecore Massesi  
o Garfagnine

G. CONTE, L. CASAROSA, P. POLI, A. SERRA, G. FORMISANO,  
M. MELE, D. CERRI, P. SECCHIARI . . . . . 68

La capra autoctona della Garfagnana:

valutazione morfofunzionale e sanitaria

F. CORRIAS, F. SALARI, A. DAL PRA', G. RAGONA, A. LOMBARDO,  
M. MARI, I. ALTOMONTE, G. COLOMBANI, P. PEDRI, B. SCOTTI,  
G. BRAJON, M. MARTINI . . . . . 69

Il Centro Regionale per il Monitoraggio delle Parassitosi:  
un centro a servizio dell'allevamento ovino e caprino  
in Campania

G. CRINGOLI, L. RINALDI, M. SANTANIELLO, I. GUARIGLIA,  
S. CARBONE, M.E. MORGOGLIONE, S. PENNACCHIO, A. BOSCO,  
G. CAPPELLI, V. MUSELLA, A. SANTANIELLO, M.P. MAURELLI . . . . . 70

Effetto di polimorfismi in geni candidati sulle caratteristiche  
qualitative del latte ovino

M. D'ANDREA, M. MELE, C. DIMAURO, F. PILLA, P. FRESI,  
C. BRACCIAFERRI, N.P.P. MACCIOTTA . . . . . 71

Sieroprevalenza dell'idatidosi in greggi montanti  
in provincia di Torino

S. DALMASSO, L. RAMBOZZI, A.R. MOLINAR MIN, L. ROSSI . . . . . 72

Inseminazione artificiale in un allevamento biologico ovino

M. DATTENA, I. MAYORGA, L. MARA, M. GALLUS, G. MELONI,  
A. LAI, A. CABIDDU, S. SALARIS . . . . . 73

Performance produttive di capre primipare di razza Sarda  
e Maltese tenute nelle stesse condizioni

N. DE RIU, C. SPANU, P. SEDDA, C. SCARANO, E. DE SANTIS,  
G. MONIELLO . . . . . 74

Effetto della tecnica di pascolamento sulla produzione  
di latte ovino

A. DI GRIGOLI, G. DI MICELI, M. TODARO, V. BELLINA,  
F. MAZZA, M.L. ALICATA, A. BONANNO . . . . . 75

Influenza della specie foraggera pascolata sulla produzione  
di latte ovino

A. DI GRIGOLI, G. DI MICELI, M. TODARO, V. GENNA, G. TORNAMBÈ,  
M.L. ALICATA, A. BONANNO . . . . . 76

Calcinosi enzootica nelle capre: esperienze personali  
nella regione Sicilia

V. DI MARCO, P.R. DELL'ARMELENA ROCHA, M. FIASCONARO,  
G. FEDERICO, V. ARONICA, S. MIGNACCA, S. MILONE, I. VAZZANA,  
M. RUSSO, M.T. CAPUCCHIO . . . . . 77

C. sintomatico in capre allevate in pascoli con *Ferula communis*

V. DI MARCO, E. BANDINO, M. RUSSO, V. ARONICA, A. PIZZIMENTI,  
S. MIGNACCA, C. PIRAINO, M. FIASCONARO, M.T. CAPUCCHIO . . . . . 78

Effetto di giorni lunghi e melatonina sulla risposta all'effetto  
maschio nella capra Sarda

G. EPIFANI, G. BOMBOI, P. SECHI, V. PASCIU, B. FLORIS . . . . . 79

Miasi cutanea degli ovini: acquisizioni ezio-patogenetiche e  
gestione terapeutica di un focolaio di infestazione nell'Italia centrale

L. ERMINI, G. GAGLIO, G. SANNA, A.P. PIPIA, A. SCALA . . . . . 80

Composizione chimica del latte di pecora in rapporto a due livelli  
di cellule somatiche

P. FORMAGGIONI, P. FRANCESCHI, S. SANDRI, F. TOSI,  
G. TEDESCHI, M. MALACARNE, P. MARIANI, A. SUMMER . . . . . 81

Effetti di infezioni mammarie monolaterali sulla produzione e composizione del latte in pecore di razza Lacaune G. GIACINTI, S. AMATISTE, A. TAMMARO, C. BOSELLI, B. RONCHI, R. ROSATI . . . . .	82	Risposta anticorpale in capre sperimentalmente infestate con <i>Sarcoptes scabiei</i> L. RAMBOZZI, A.R. MOLINAR MIN, A. MENZANO, L. ROSSI . . . . .	98
Valutazione del latte ovino come bioindicatore della contaminazione del suolo da PCB E. HERRERA, M. ESPOSITO, L. BALDI, G. ROSATO, G. COLARUSSO, S. CAVALLO, R. D'AMBROSIO, F. SERPE, P. TURNO, M. AMORENA . . . . .	83	La GAS (Gene Assisted Selection) per il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte di capra L. RAMUNNO, A. PAUCIULLO, A. RANDO, P. CREPALDI, F. PILLA, D. GALLO, L. COLIMORO, A. D'AVINO, S. MURRU, P. FRESI, B. CAPOGRECO, F. DE NARDO, P. MASINA, G. COSENZA, D. DI BERARDINO . . . . .	99
Risposta immune in pecore infettate con <i>Mycoplasma agalactiae</i> M.P. LA MANNA, A. AGNONE, S. VILLARI, R. PULEIO, A. TAMBURELLO, A. DI DONATO, G.R. LORIA, G. SIRECI . . . . .	84	Duplicazione al locus dell'alfa lattoalbumina nei ruminanti: evidenze negli ovini R. RULLO, A. DI LUCCIA, I. ALLOGGIO, E. PIERAGOSTINI . . . . .	100
Adenocarcinoma intestinale ovino: descrizione di un caso E. LEPRI, G. FILIPPINI, I. DI MATTEO, N. D'AVINO, P. MANGILI, G. VITELLOZZI . . . . .	85	Bilancio di 10 anni di selezione per la resistenza genetica alla Scrapie nella popolazione iscritta al Libro Genealogico della razza ovina Sarda S. SALARIS, A. PERNISA, L. CRASTA, A. FRAGHÌ, P. FRESI, SARA CASU, A. CARTA . . . . .	101
Primi risultati di proteomica clinica nell'anaplasmosi negli ovini P. LOIZZO, I. ALLOGGIO, A. TRANI, E. PIERAGOSTINI . . . . .	86	Valorizzazione di formaggi tradizionali della regione Marche S. SANTARELLI, V. BABINI, L. AQUILANTI, C. GAROFALO, A. OSIMANI, F. CLEMENTI . . . . .	102
Descrizione di un episodio abortivo sostenuto da <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> in un allevamento ovino e caprino C.F. MAGISTRALI, N. D'AVINO, E. MANUALI, M. BIAGETTI, A. DETTORI, G. ZABALDANO, P. MANGILI, M. LAURENTI, G. FILIPPINI . . . . .	87	Studio degli effetti della selezione per la resistenza alla scrapie sulla variabilità genetica nella razza ovina Sambucana S. SARTORE, R. RASERO, S. COLUSSI, P.L. ACUTIS, S. PELETTI, D. SOGLIA, S. MAIONE, V. SPALENZA, P. SACCHI . . . . .	103
Cheratinizzazione del ruminale e BCS in pecore utilizzate nella prevenzione degli incendi A. MALFATTI, P. SCOCCO, C. BELARDINELLI, R. GATTI, F. MERCATI, C. DALL'AGLIO, A. CATORCI . . . . .	88	Verifica di un QTL per la resistenza ai nematodi identificato nel cromosoma 12 ovino attraverso la densificazione della mappa genetica e l'utilizzo di un'ulteriore generazione di discendenti S. SECHI, SARA CASU, M.G. USAI, G. MULAS, G. SANNA, A.P. PIPIA, A. CARTA, A. SCALA . . . . .	104
L'infezione da <i>Eimeria</i> nel capretto in allevamenti a diverso sistema di conduzione M.T. MANFREDI, C. FRAQUELLI, M. CAVAZZONI, S. ZANZANI . . . . .	89	Contenuto in cellule somatiche nel latte di capre primipare di razza Sarda e Maltese C. SPANU, N. DE RIU, C. SCARANO, V. SPANU, F. COSSU, P. SEDDA, G. MONIELLO, E. DE SANTIS . . . . .	105
La RM nella diagnostica della cenurosi cerebrale ovina M.L. MANUNTA, M.A. EVANGELISTI, N. COLUMBANO, E. SANNA PASSINO . . . . .	90	Antibiotico resistenza di ceppi di <i>S. aureus</i> isolati da latte di capra allevata in Sardegna V. SPANU, S. VIRDIS, C. PENNA, E. MURA, C. SPANU, C. SCARANO, E. DE SANTIS . . . . .	106
Comparazione fra quadri clinici, rilievi microbiologici nel latte e altri parametri di allevamento in greggi caprine con problemi di mastite infettiva G. MAROGNA, C. PILO, A. VIDILI, S. TOLA, G. SCHIANCHI, S.G. LEORI . . . . .	91	Caratteristiche spermatiche epididimali di razze ovine venete C. STELLETTA, N.S. JUYENA, A. CALABRIA, N. TORMEN, V. BONDESAN . . . . .	107
Utilizzo di Fitover/O Plus® nel controllo dei nematodi in ovi-caprini in provincia di Trento G. MINGHETTI, A. PECILE, E. MASIN, S. ZANUTTO, M. VOLANTI, D. DELLAMARIA, E. FRANCIONE, G. FARINA, G. CAPELLI . . . . .	92	Influenza del tipo di salatura sulle caratteristiche del Pecorino Siciliano DOP M. TODARO, G. TORNAMBÈ, F. MAZZA, S. PASSALACQUA, A. MUNÌ, S. SANGIORGI . . . . .	108
Prova di svezzamento precoce dell'agnello di razza Comisana: primi risultati V.M. MORITTU, G. NEGLIA, G. TARANTINO, P. ROSSI, G. CAMPANILE . . . . .	93	Influenza del genotipo per l'alfa (s1)-caseina sulla qualità del latte di capre Maltesi M. TODARO, A. DI GRIGOLI, G. TORNAMBÈ, P. DI GREGORIO, P. GIACCONE, A. BONANNO . . . . .	109
Tipizzazione molecolare di ceppi di <i>Staphylococcus aureus</i> isolati da latte ovino B. PATERNESI, M. CAGIOLA, A. VALIANI, S. BENDA, G. CURINA, P. MAZZONE, K. FORTI, A. DE GIUSEPPE . . . . .	94	Sieroprevalenza di <i>Coxiella burnetii</i> in ovicaprini della provincia di Bergamo V. TRANQUILLO, A. GAFFURI, E. TESTA, F. PATERLINI . . . . .	110
Rilievi clinici in ovini infettati sperimentalmente con <i>Anaplasma ovis</i> F. PETAZZI, I. ALLOGGIO, G. RUBINO, G. BRAMANTE, E. PIERAGOSTINI . . . . .	95	Studio dell'espressione del gene Stearoyl-CoA desaturasi nelle cellule somatiche del latte di capre allevate con il sistema biologico R. TUDISCO, S. CALABRÒ, M.I. CUTRIGNELLI, G. MONIELLO, M. GROSSI, O.J. GONZALEZ, V. PICCOLO, F. INFASCELLI . . . . .	111
Identificazione elettronica e retinografie per caratterizzare ovini di razza Sarda W. PINNA, M.G. CAPPALÀ, G. NIEDDU, L. MACCIOTTA, V. PETRUZZI . . . . .	96	Isolamento di <i>Brucella spp.</i> in allevamenti ovini e caprini siciliani nel triennio 2007-2009 D. VICARI, L. GALUPPO, S. MARINEO, L. LIPARI, V. RANDAZZO, S. CARACAPPA . . . . .	112
Effetto della riduzione del numero di mungiture giornaliere sulla produzione latte in ovini di razza Sarda M. PIRAS, M.G. USAI, S. SALARIS, A. CARTA, SARA CASU . . . . .	97		



## Sessione poster

Episodio di gozzo di probabile origine nutrizionale in un gregge del centro Italia F. AGNETTI, R. AGOSTINI, E. MANUALI, C. BARTOLINI, P. MANCINI, M. STORACI, F. TONUCCI .....	114
Effetto dello stress acuto sulle performance produttive della pecora da latte M. CAROPRESE, M. ALBENZIO, L. SCHENA, R. MARINO, A. SANTILLO, A. SEVI .....	115
Effetto del verbascoide sui parametri ematici e produttivi in pecore Lacaune D. CASAMASSIMA, M. PALAZZO, G. MARTEMUCCI, F. VIZZARRI, C. CORINO .....	116
Analisi di elementi in traccia in campioni di latte ovino e caprino A.E. CHIARAVALLE, G. MARCHESANI, M. MANGIACOTTI .....	117
Immunità cellulo-mediata e utilizzo di lino estruso nella dieta di ovini da latte G. CURINA, B. PATERNESI, M. CAGIOLA, M. TRABALZA-MARINUCCI, L. MOSCATI, O. OLIVIERI, G. ACUTI .....	118
Episodio abortivo attribuibile a <i>Y. pseudotuberculosis</i> in un allevamento ovino dell'Italia centrale N. D'AVINO, L. ERMINI, G. FILIPPINI, C.F. MAGISTRALI, E. MANUALI, P. PAPA, P. MANGILI .....	119
Variazioni quali-quantitative del latte di capra in relazione allo stadio di lattazione A. DAL PRA, G. RAGONA, A. LOMBARDO, A. PIAZZA, I. PALADINI, I. TELLINI, F. TACCORI, R. CAVALLINA, S. AMATISTE, G. GIANCOLINI, F. CORRIAS, G. BRAJON .....	120
Il sistema orexinico e il recettore CB1 nella ghiandola mandibolare di pecora C. DALL'AGLIO, L. PASCUCCHI, F. MERCATI, C. BOITI, P. CECCARELLI ..	121
Effetto del genotipo al locus della $\alpha s1$ -caseina e della dieta sulle proprietà di coagulazione del latte di capre di razza derivata di Siria A. DI TRANA, P. DI GREGORIO, M. PIZZILLO, G. MAGGIO, V. PACE, M.A. DI NAPOLI .....	122
Effetti di differenti cotici erbosi sulle caratteristiche del formaggio di <i>Capra dell'Aspromonte</i> F. FOTI, M. SCERRA, L. BUMBACA, P. CAPARRA, C. CILIONE, A. GIORGI, S. POSTORINO1, V. SCERRA .....	123
Le strongilosi broncopolmonari dei caprini in Sardegna: aggiornamenti epidemiologici G. GARIPPA, M. CULMONE, N. GURIA, S. MELE, M.C. PIRAS, G. TILOCCA, P. MERELLA .....	124

Superovulazione in pecore di 10 mesi di età con FSH di origine suina e ovina F.A. HOZBOR, J. MANES, N.C. MUCCI, G. CUESTAS, L. VINCENTI, A. RICCI, Y.H.E. SANCHEZ .....	125
Parziale stima dei danni economici provocati dalle mastiti batteriche in allevamenti ovini della Sardegna G. MAROGNA, C. PILO, G. SCHIANCHI, G.S. LEORI .....	126
Effetto della modifica della tecnica di svezzamento sulla produzione di pecorino Carmasciano F. MASUCCI, C.M.A. BARONE, M.T. GORGITANO, A. ZULLO, M.L. VARRICCHIO, A. DI FRANCIA .....	127
Immunità innata e stato ossidativo in pecore da latte allevate secondo il metodo biologico L. MOSCATI, A. VALIANI, M.T. LONDINO, E. DURANTI, M. PAUSELLI .....	128
Caratteristiche microbiologiche di un formaggio di nicchia: "Il Caprino del Covo" A. PETRUZZELLI, F. PAOLINI, S. BALDASSARRI, N. ORAZIETTI, F. CIARROCCHI, F. TONUCCI, G. BLASI .....	129
Parassiti degli ovini trasmessi da zecche: osservazioni epidemiologiche in Puglia E. PIERAGOSTINI, G. DE RUVO, A. ALONGI, S. SCIMECA, A. TORINA .....	130
Imponente perdita di miniboli per l'identificazione elettronica di capre di razza Maltese W. PINNA, G. NIEDDU, M. PICCIAU, M.G. CAPPAL, M.P.L. BITTI .....	131
Espressione genica differenziale in capre infettate con <i>Staphylococcus aureus</i> G. PISONI, P. CREMONESI, R. CAPOFERRI, F. STROZZI, A. STELLA, P. MODESTO, M. DEL CORVO, L. SCACCABAROZZI, P. MORONI, J. WILLIAMS, B. CASTIGLIONI .....	132
Contenuto in antiossidanti nel latte e formaggio ovini ottenuti con metodo biologico V. ROSCINI, E. MOURVAKI, L. BIANCHI, D. DONNINI, A. VALIANI, E. DURANTI, M. PAUSELLI .....	133
Valutazione dei parametri lattodinamografici sul latte bovino, ovino e caprino congelato M. TODARO, M.L. SCATASSA, L. ARCURI, P. GIACCONE, S. CARACAPPA .....	134
Resistenza genetica ai parassiti gastrointestinali in due razze ovine italiane G. VENDITTI, N. D'AVINO, C. SEBASTIANI, P. CALZONI, L. MOSCATI, M. BIAGETTI, F. CECCHI, R. CIAMPOLINI, F. MACCHIONI, F. FILIPPINI .....	135

## Sessione Simposi Satellite

<i>Clostridiosi e Mannheimiosi</i> : dalle diversità anatomopatologiche alle affinità patogenetiche F. ALOISIO .....	138
Aspetti clino-diagnostici differenziali delle Clostridiosi e Pasteurellosi V. DI MARCO .....	139
La vaccinazione nella gestione della clostridiosi, della mannheimiosi e della pasteurellosi degli ovini L. ERMINI .....	140
Sviluppo scientifico, prove cliniche e produzione industriale di vaccini per ovini e bovini contro la Blue Tongue P. HUDELET .....	141

Esperienze di campo nella gestione clinica e nella profilassi vaccinale di focolai di BTV 8 negli ovini in Francia P. AUTEF. ....	142
Implicazioni epidemiologiche e zootecniche del <i>periparturient egg rise</i> nell'allevamento ovino M.T. MANFREDI. ....	143
Peri Partum Rise: le soluzioni Pfizer A. SORIOLO. ....	144
Biology of <i>Coxiella burnetii</i> and host response to infection A. RODOLAKIS, D. COCHONNEAU. ....	145
Febbre Q: aspetti epidemiologici in Italia M. FABBÌ .....	150

**Le patologie  
causate dai retrovirus  
negli allevamenti  
ovini e caprini:  
le nuove prospettive  
del settore della ricerca  
e le esperienze maturate  
nei piani di controllo**



# Studio della prevalenza del complesso CAEV-MV negli allevamenti ovi-caprini di alcune Regioni italiane



F. FELIZIANI<sup>A</sup>, E. STANGHELLINI<sup>B</sup>, M.G. RANALLI<sup>B</sup>, M. GIAMMARIOLI<sup>A</sup>,  
M. GUIDONI<sup>C</sup>, G. PERUGINI<sup>A</sup>, N. PONTI<sup>D</sup>, G. PURPARI<sup>E</sup>, I. RICCI<sup>C</sup>, S. ROSATI<sup>F</sup>

<sup>A</sup> IZS Umbria e Marche - <sup>B</sup> Dipartimento di Economia, Finanza e Statistica Università di Perugia

<sup>C</sup> IZS Lazio e Toscana - <sup>D</sup> IZS Sardegna - <sup>E</sup> IZS Sicilia - <sup>F</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Torino

**Parole chiave:** Lentivirus, allevamenti ovi-caprini, siero prevalenza.

**INTRODUZIONE** - L'infezione da Lentivirus dei piccoli ruminanti è diffusa praticamente in tutto il mondo e programmi di eradicazione o di sorveglianza, per lo più su base volontaria, sono stati intrapresi in diversi paesi. In Italia manca ancora un quadro d'insie-

me perché le indagini fino ad ora condotte sono state svolte su territori limitati e soprattutto sono stati utilizzati diversi metodi d'indagine con risultati difficilmente confrontabili. Il Ministero della Salute ha finanziato una ricerca con l'obiettivo di stimare la prevalenza di infezione da Lentivirus nelle popolazioni ovine e caprine del nostro paese e di individuare possibili strategie di controllo.

**Tabella 1** - Allevamenti per territorio e tipologia - valori assoluti - e allevamenti per territorio nel campione - valori assoluti - e relativo tasso di sondaggio.

Allevamenti	Agrigento	Grosseto	Macerata	Palermo	Perugia	Pisa	Sardegna	Totale
Ovini	1.083	1.512	974	2.084	597	398	12.000	18.648
Caprini	307	128	237	802	99	268	3.200*	5.041
<b>Totale allevamenti</b>	<b>1.390</b>	<b>1.640</b>	<b>1.211</b>	<b>2.886</b>	<b>696</b>	<b>666</b>	<b>15.200</b>	<b>23.689</b>
Allevamenti campionati	65	73	90	77	68	53	58	484
Tasso di sondaggio %	4,7	4,5	7,4	2,7	9,8	8,0	0,4	2,0

**Tabella 2** - Allevamenti infetti per territorio e livello di prevalenza (distribuzioni percentuali).

Prevalenza	Agrigento	Grosseto	Macerata	Palermo	Perugia	Pisa	Sardegna	Totale
Altissima	6,9	9,1	19,8	7,9	12,5	7,3	13,2	12,1
Alta	17,2	25,8	30,9	19,0	29,2	34,1	34,0	30,5
Bassa	75,9	65,2	49,4	73,0	58,3	58,5	52,8	57,4
<b>Totale</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

**Tabella 3** - Allevamenti ovini per territorio e livello di prevalenza (distribuzioni percentuali).

Territorio	Altissima %	Alta %	Bassa %	Indenne %	Distribuzione %
Agrigento	6,5	14,5	69,4	9,7	6,5
Grosseto	8,2	23,3	58,9	9,6	8,0
Palermo	4,2	13,9	59,7	22,2	13,1
Pisa	2,6	23,7	44,7	28,9	2,3
Sardegna	5,5	30,9	50,9	12,7	70,1
<b>Totale</b>	<b>5,5</b>	<b>26,8</b>	<b>53,8</b>	<b>13,9</b>	<b>100,0</b>

**Tabella 4** - Allevamenti caprini per territorio e livello di prevalenza (distribuzioni percentuali).

Territorio	Altissima %	Alta %	Bassa %	Indenne %	Distribuzione %
Agrigento	15,2	12,1	33,3	39,4	33,1
Palermo	16,7	16,7	30,0	36,7	52,7
Pisa	16,7	25,0	37,5	20,8	14,2
<b>Totale</b>	<b>16,2</b>	<b>16,3</b>	<b>32,2</b>	<b>35,3</b>	<b>100,0</b>

**METODI** - Per l'indagine sierologica è stato impiegato un kit ELISA sperimentale per la sierodiagnosi di Lentivirus in ovini e caprini. Il test è stato allestito con una proteina di fusione costituita dall'antigene capsidico (CA) e dagli epitopi immuninodominanti della proteina di Transmembrana (TM) come preventivamente descritto da Rosati S. et al. (J Virol. Methods 2004, 121,1, 73-78): una proteina di fusione P16-P25 è stata realizzata ed espressa in forma ricombinante.

Lo studio ha coinvolto alcuni territori in cui l'allevamento ovi-caprino è particolarmente sviluppato; è stato utilizzato un campionamento a due stadi con selezione randomizzata: sono stati campionati gli allevamenti (primo stadio) ponendo una prevalenza attesa per territorio del 75% ed un errore massimo ammesso del 10%, quindi i capi (secondo stadio) all'interno degli allevamenti ipotizzando una prevalenza del 20% per uno stesso margine di errore.

È stato definito "caso" l'allevamento infetto caratterizzato da almeno un soggetto sieropositivo e un questionario è stato predisposto per la raccolta di dati anagrafici ed epidemiologici

**RISULTATI** - L'indagine ha coinvolto le seguenti realtà territoriali: province di Agrigento, Grosseto, Macerata, Palermo, Perugia, Pisa e la Regione Sardegna. In totale sono state coinvolte nello studio 513 aziende ed analizzati 21300 capi.

Nei sette territori è stata riscontrata una prevalenza media di allevamenti infetti di circa l'85%; le province di Pisa e Perugia registrano valori al di sotto dell'80%, mentre nella provincia di Grosseto e nella regione Sardegna si stima una prevalenza superiore al 90%. Sono state analizzate anche diverse variabili quali la specie allevata, indirizzo produttivo e altre caratteristiche zootecniche. In generale gli allevamenti ad indirizzo carne risultano più colpiti di quelli da latte, ma differenze rilevanti sono state registrate soprattutto su base territoriale.

**CONCLUSIONI** - La ricerca mette in luce che l'infezione da Lentivirus è endemica nelle popolazioni ovine e caprine del nostro paese, ma diversa è la pressione esercitata nei diversi territori. In alcune zone gli allevamenti indenni arrivano al 30% e questo rende possibile ipotizzare programmi di controllo dell'infezione. Le differenze anche rilevanti, che hanno evidenziato realtà territoriali attigue, indicano la necessità di allestire piani di intervento mirati e su piccola-media scala.

#### ■ Flock-level seroprevalence survey of Small Ruminants Lentiviruses in several Italian territories

**Key words:** Lentivirus, sheep and goats flocks, sero-prevalence.



# Il piano volontario di eradicazione dalla C.A.E.V. nella comunità montana "Langa Astigiana - Val Bormida"



A. QUASSO

ASL 19 Asti

**LA SITUAZIONE STORICA** - Del territorio della Comunità Montana Langa Astigiana - Val Bormida fanno parte 12 Comuni, con un patrimonio caprino di circa 5800 capi da riproduzione di razze ad elevata attitudine lattifera. Il latte prodotto viene pressoché totalmente utilizzato per la trasformazione casearia nella ROBIOLA DI ROCCAVERANO, unico formaggio caprino italiano a D.O.P. riconosciuto con DPR 14/03/1979.

Fin dall'inizio degli anni '80, dopo l'eradicazione della brucellosi ovi-caprina in tutti gli allevamenti del comprensorio, si è assistito al preoccupante fenomeno, evidenziato e più volte denunciato da parte degli allevatori medesimi, dell'aumento di forme cliniche di artrite e mastite delle capre adulte.

Una prima indagine sierologica, eseguita nel 1988 dal Servizio Veterinario della allora USSL 69 di Nizza Monferrato (At), ora ASL AT di ASTI, utilizzando il test AGID della locale sezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, aveva mostrato una notevole diffusione dell'infezione, con un tasso di positività nei confronti del virus CAE di oltre il 50% dei capi sottoposti a controllo. Una indagine successiva (1993), eseguita in collaborazione tra il Servizio Veterinario della ASL AT di

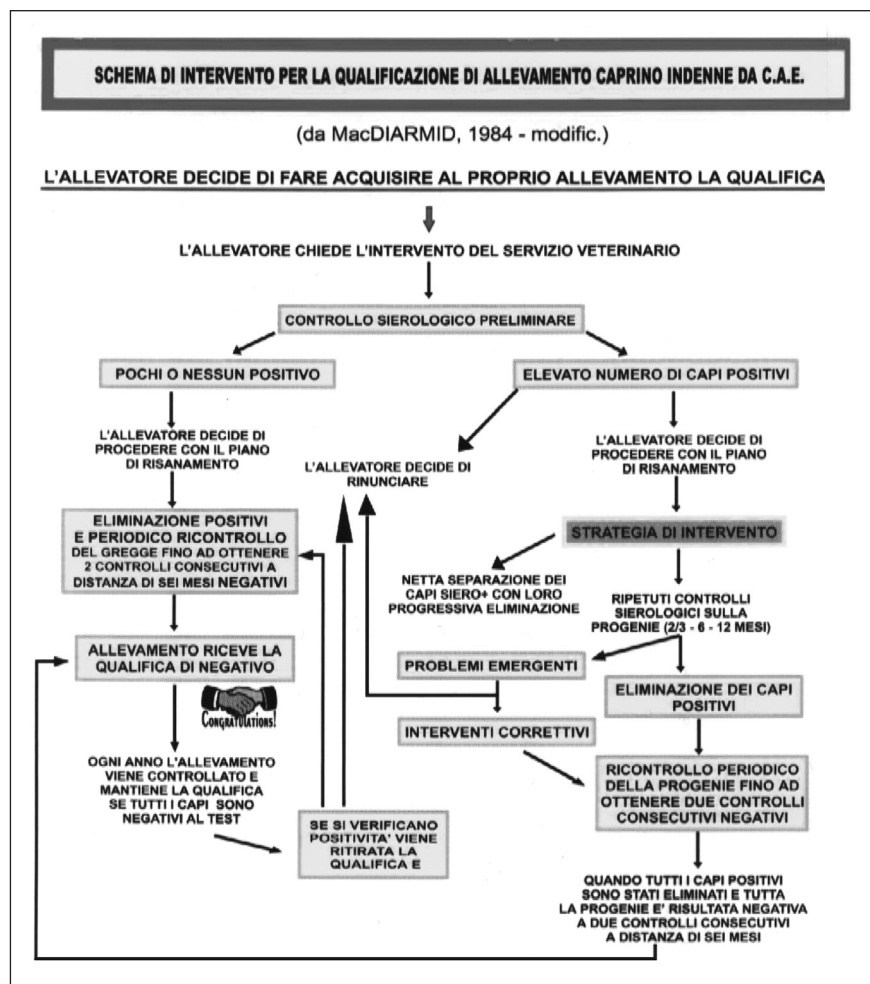
Asti e l'Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino, con l'impiego di test diagnostici maggiormente sensibili e specifici (Elisa e Western Blotting), evidenziava un tasso di sieropositività del 72% dei soggetti controllati e del 100% degli allevamenti controllati; i dati anamnestici raccolti dai Veterinari che operavano sul territorio, inoltre, indicavano che la malattia si era diffusa praticamente in tutti gli allevamenti, e tendeva a manifestarsi clinicamente su animali sempre più giovani.

A fronte della grave situazione sanitaria determinata dalla elevata percentuale di capi ed allevamenti infetti da CAE, dei danni economici emergenti e delle perdite di reddito degli allevamenti maggiormente colpiti dall'infezione, venne avviato, nella primavera del 1994, un **piano - pilota** di intervento per il controllo e l'eradicazione dell'infezione, condotto secondo lo schema riportato di seguito, che ha interessato un primo gruppo di allevamenti caprini.

Tale piano ha visto l'impegno congiunto di diversi Enti e Associazioni, che hanno tra loro collaborato in modo sinergico al raggiungimento dell'obiettivo. In particolare:

- il Servizio Veterinario della ASL AT di Asti ha messo a disposizione il personale veterinario per l'esecuzione dei campioni di sangue e dei controlli periodici negli allevamenti interessati dal progetto;
- l'Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino ha messo a disposizione i laboratori e il personale per l'esecuzione dei test sierologici ed ha fornito l'indispensabile supporto scientifico all'iniziativa;
- l'Associazione Allevatori della Provincia di Asti ha fornito il supporto tecnico-logistico, reperendo anche, in una prima fase, i fondi economici necessari all'avvio del programma;
- l'Assessorato all'Agricoltura, Caccia e Pesca della Provincia di Asti ha rilevato, in un secondo tempo, l'impegno economico, facendo fronte alle risorse finanziarie necessarie per la prosecuzione del piano;
- la Comunità Montana Langa Astigiana - Val Bormida ha appoggiato l'iniziativa facendo opera di informazione presso gli allevatori caprini, coordinando la fase di divulgazione al fine di ampliare l'adesione al piano volontario di controllo ed eradicazione dell'infezione.

Il piano-pilota ha inizialmente coinvolto 5 allevamenti caprini per un totale di 320 capre adulte; tali soggetti sono stati individualmente testati mediante esame sierologico con metodo Elisa; sono risultati positivi nei confronti del CAEV 283 soggetti, pari al 88% circa dei capi considerati e pertanto, data l'e-



levatissima prevalenza dell'infezione, la strategia di intervento scelta è stata la seguente:

- creazione di un nucleo di soggetti da rimonta indenni da CAEV, per ciascun allevamento considerato, a partire dalla progenie nata nel 1995;
- predisposizione di locali di allevamento, per tale progenie, nettamente separati dal resto dell'allevamento;
- avvio alla macellazione di quei soggetti adulti che presentassero gravi sintomi clinici della malattia;
- allontanamento immediato, al momento della nascita, delle caprette della progenie nata nel 1995, evitando lambitura e allattamento materno, e fornendo una alimentazione sostitutiva a base di colostro e latte artificiale;
- controlli sierologici ripetuti sulla tale progenie all'età di 3, 6, 8 e 12 mesi, al fine di individuare il più precocemente e rapidamente possibile i soggetti che, pur allevati con la metodica descritta ai punti precedenti, avessero sierconvertito positivamente nei confronti del virus CAE, con loro immediato allontanamento dal gruppo "progenie" e transito nel gruppo "adulti infetti";
- progressiva eliminazione dall'allevamento, con loro invio alla macellazione, dei soggetti adulti sieropositivi senza sintomi clinici manifesti, al fine di diminuire progressivamente la circolazione ambientale del virus.

Questo articolato sistema di intervento, ripetuto ed intensificato negli anni successivi, ha consentito di ottenere i risultati esposti nella Tabella 1.

L'analisi dei dati raccolti durante l'esecuzione del piano-pilota ha fatto emergere chiaramente la possibilità di ottenere, già nel corso dei primi due-tre anni di applicazione delle misure sanitarie esposte precedentemente, ottimi risultati, purché vengano rispettate alcune fondamentali condizioni:

- gli **allevatori** che decidono di aderire ad un piano volontario di questo tipo devono essere **fortemente motivati**, e sapere che il loro impegno risulta fondamentale per la buona riuscita del progetto;
- la completa e totale **separazione della progenie** destinata alla creazione del nucleo indenne dal resto dell'allevamento infetto rappresenta il punto nevralgico di tutta l'operazione: tanto più questa misura viene scrupolosamente attuata, tanto maggiori sono le possibilità di successo del piano di eradicazione nell'allevamento;
- la possibilità di eseguire **ripetuti e ravvicinati controlli sierologici** sulla rimonta da destinare alla costituzione dell'effettivo indenne dalla malattia è un altro nodo fondamentale per la buona riuscita delle operazioni, e ciò comporta la messa in atto di puntuali e precisi scadenziari di intervento da parte del personale che esegue i prelievi ematici, la disponibilità di test sierologici affidabili, tempi di risposta rapidi da parte del laboratorio di analisi e disponibilità economiche sufficienti a far fronte ai costi globali di intervento;
- l'allontanamento per la **macellazione dei soggetti con sintomi clinici** e, appena possibile, anche dei soggetti semplicemente **sieropositivi** deve essere fortemente incentivata, al fine di diminuire rapidamente la circolazione ambientale del virus e prevenire le occasioni fortuite di reinfezione dei soggetti sani.

A fronte di questo notevole impegno, i risultati sono stati tangibilmente ed immediatamente riscontrabili in tutta la loro eccezionalità. I primi ad accorgersi del salto di qualità che stava facendo il loro allevamento sono stati gli allevatori medesimi, che hanno direttamente rilevato che:

- le caprette allevate per la creazione del nucleo indenne presentavano mediamente un miglior fenotipo, crescevano con più rapidità, manifestavano una superiore vitalità e richiedevano un minor numero di interventi terapeutici per correggere carenze alimentari o curare infezioni intercorrenti;
- diminuivano le perdite di soggetti giovani per malattie opportuniste e/o altre cause;
- il costo del ricorso all'alimentazione con latte artificiale veniva abbondantemente coperto e superato dalla maggiore disponibilità di latte per la caseificazione e, di conseguenza, dalla produzione di formaggio;
- i benefici erano ulteriormente amplificati nel momento in cui entravano in produzione le caprette del primo nucleo indenne: queste, infatti, non richiedevano più l'assistenza al momento del parto per la sottrazione della prole e presentavano una produzione lattifera già in prima lattazione superiore alla media.

**L'EVOLUZIONE DEL PROGETTO** - Il principale problema che è emerso nel corso del piano-pilota fin qui descritto è rappresentato dalla difficoltà, cui gli allevatori si sono trovati a dover far fronte, nella realizzazione di una completa ed efficace separazione, dal resto dell'allevamento, della progenie ricavata dalle madri infette e che doveva servire da nucleo di ricostituzione indenne.

Complice una situazione geo-climatica sfavorevole e la cronica mancanza di personale, nella quasi totalità dei casi gli allevatori non disponevano di strutture di allevamento tali da consentire una gestione nettamente separata di due o più gruppi di animali di stato sanitario differente. Si deve infatti considerare che la gestione, almeno nell'immediato, di un gruppo di animali esenti da CAEV coabitanti nel medesimo allevamento con un gruppo di animali infetti da CAEV richiede la disponibilità di locali di stabulazione e pascoli nettamente distinti, attrezzature e materiali di governo altrettanto distinti per ciascun gruppo, e che il personale che si occupa del gruppo indenne non si occupi contemporaneamente anche del gruppo degli infetti, e ciò naturalmente al fine di impedire, quanto più possibile, che vi sia circolazione per via diretta o indiretta, del virus dal secondo al primo gruppo di animali.

Il mantenimento in allevamento del gruppo di animali infetti si rendeva purtroppo indispensabile, a fronte dei problemi che creava e dei pericoli che comportava, almeno nelle fasi di avvio di un piano di eradicazione della CAE nelle greggi con elevata prevalenza dell'infezione, per alcuni motivi:

- il gregge degli animali infetti rappresentava, per tutti gli allevatori, l'unica fonte da cui attingere una prole utile a costituire un gruppo di soggetti esenti da CAEV;
- per tutti gli allevatori risultava economicamente insostenibile attuare un piano di eradicazione che prevedesse l'invio simultaneo alla macellazione dei soggetti infetti per sostituirli con soggetti esenti da CAEV, sia per il non indifferente costo economico, sia per le difficoltà e l'incertezza del successivo approvvigionamento di capi con le caratteristiche sanitarie richieste;

- trattandosi inoltre di allevatori-produttori di latte destinato alla trasformazione casearia nel prodotto a D.O.P. "Robiola di Roccaverano" e che commercializzano per lo più direttamente il prodotto, di cui vi è una forte richiesta da parte dei consumatori, subentrava il fondamentale problema di non perdere la principale e a volte unica fonte di reddito per l'intero nucleo familiare, e di poter sfruttare la produzione di latte del gregge infetto almeno fintanto che non fosse entrato in produzione il nucleo di capi indenni.

**Tabella 1** - Risultati del piano - pilota anni 1995 - 1997.

Allev.	Consistenza capi (1994)	% di infezione	Progenie sieronegativa 1995	Progenie sieronegativa 1996	Progenie sieronegativa 1997	Totale progenie sieronegativa (fine 1997)
1	115	96	37	47	44	128
2	76	97	13	33	31	77
3	66	73	11	13	18	42
4	37	81	12	10	19	41
5	26	80	14	16	18	48



Oltre a queste considerazioni è stato poi aggiunto un altro aspetto di tipo etico e psicologico: si è infatti ritenuto che il coinvolgimento degli allevatori nel piano, richiedendo loro un impegno ed uno sforzo personale in termini di crescita culturale, potesse rivelarsi molto più produttivo ed efficace nel consolidare i risultati raggiunti. Ciò si è dimostrato in seguito assolutamente veritiero, poiché gli allevatori che hanno aderito al piano hanno mostrato una attenzione spasmodica nel mettere in atto tutte le misure igienico-sanitarie utili a mantenere uno stato di indennità nei confronti della malattia una volta che questa era stata eradicata dal loro allevamento, consci dello sforzo e della fatica compiuta per ottenere il risultato desiderato ed altresì avendo toccato con mano i benefici che ciò aveva loro portato.

Lo stesso risultato, probabilmente, non si sarebbe ottenuto attraverso l'acquisto e la fornitura agli allevatori di greggi indenni da CAEV "chiavi in mano", che fossero andati a sostituire il loro gregge infetto, poiché ciò non avrebbe prodotto il miglioramento culturale necessario a far consolidare nel tempo i risultati sanitari.

Accertato, quindi, che la grande maggioranza degli allevatori della zona sarebbe stata seriamente intenzionata ad aderire ad un piano di eradicazione, ma che d'altro canto l'adesione veniva frenata dalle difficoltà precedentemente accennate, è stata elaborata una evoluzione del piano, attraverso una strategia globale innovativa di intervento, che si basava sull'impiego dei cosiddetti CENTRI DI ALLEVAMENTO.

**FASI E METODI DELL'INTERVENTO** - La strategia di intervento prevedeva la messa in atto di diverse fasi, che di seguito vengono elencate e poi sviluppate singolarmente nel dettaglio.

- **FASE 1:** controllo sierologico delle greggi degli allevamenti aderenti;
- **FASE 2:** predisposizione inizialmente di uno, ed in seguito di numerosi, **CENTRI COMUNI DI ALLEVAMENTO**, attrezzati con box di allevamento, pascoli adiacenti e strutture di supporto;
- **FASE 3:** conferimento, da parte degli allevatori aderenti al programma di eradicazione, della progenie nata a partire dall'anno 1998 (primo anno di attivazione dei CENTRI), per il suo allevamento in condizioni di isolamento dalle greggi infette;
- **FASE 4:** controlli sierologici ripetuti, alle scadenze previste, sui soggetti conferiti ai CENTRI, al fine di saggiarne lo stato sanitario nei confronti della CAEV;
- **FASE 5:** al raggiungimento dell'età riproduttiva, inseminazione delle caprette attraverso l'utilizzo di maschi riproduttori geneticamente miglioratori;
- **FASE 6:** all'età di 10-11 mesi, rientro delle caprette della progenie indenne negli allevamenti da risanare, ripopolandoli con l'utilizzo del sistema "tutto vuoto - tutto pieno";
- **FASE 7:** ripetizione delle operazioni negli anni successivi e per un certo numero di anni consecutivi, fino al raggiungimento di un consistente numero di allevamenti caprini indenni da CAEV.

La complessità del progetto richiede una sua dettagliata analisi ed approfondimento, che di seguito vengono sviluppati.

**FASE 1** - Il controllo sierologico delle greggi degli allevamenti aderenti è stata la fase preliminare indispensabile, al fine di stabilire, a seconda della prevalenza dell'infezione riscontrata in ogni singolo allevamento aderente, il tipo di strategia di intervento da adottare. A questo proposito si è fatto riferimento alle modalità operative evidenziate nello schema 1: se la prevalenza di infezione riscontrata era molto elevata (> del 15 - 20%), si procedeva con il tipo di strategia visualizzato nel lato destro dello schema; se viceversa la prevalenza era nulla o bassa, si procedeva secondo la strategia visualizzata nel lato sinistro dello schema. Il riscontro pressoché generalizzato di una situazione di prevalenza dell'infezione elevata ha determinato costantemente il ricorso alla strategia d'intervento attraverso l'utilizzo dei Centri Comuni di Allevamento: un solo allevamento, in cui si è riscontrata una prevalenza inferiore al 5%, ha potuto essere liberato dall'infezione con l'impiego della strategia di intervento mediante eliminazione dei capi infetti e periodico ricontrollo.

**FASE 2** - La creazione di un **CENTRO COMUNE DI ALLEVAMENTO** è stato il momento qualificante ed innovativo di tutta la

strategia di intervento. Si è trattato, in sostanza, di organizzare una struttura da adibire all'allevamento, in condizioni nettamente separate dalle greggi di origine, delle caprette che sarebbero andate a costituire la rimonta indenne da CAEV.

Nel territorio della Comunità Montana "Langa Astigiana - Val Bormida" erano presenti numerose strutture, un tempo adibite a stalle per bovini, anche di costruzione recente, razionalmente edificate, con pascoli adiacenti a disposizione e situate in località di facile accesso, che risultavano inutilizzate a causa della cessazione dell'attività da parte dei proprietari. La stessa Comunità Montana disponeva o aveva in uso strutture di allevamento che sarebbero potute essere utilizzate per lo scopo che ci si prefiggeva.

Durante il primo anno di avvio del programma, sono state individuate tre strutture, dislocate in località diverse al fine di garantire la copertura di tutto il territorio, le quali, attraverso un intervento di ristrutturazione ed adeguamento di ciò che era già esistente, sono state predisposte per accogliere ed allevare i capi.

In questo modo si è ottenuto il duplice risultato di:

- realizzare l'efficace ed effettiva separazione della progenie dalle greggi infette, ovviando alla principale difficoltà cui gli allevatori non erano in grado di fare individualmente fronte;
- concentrare in un unico luogo un consistente numero di soggetti, il che consentiva di ottimizzare e razionalizzare tutti gli interventi che su questi dovevano essere successivamente eseguiti.

A questo proposito sono stati realizzati, rivelandosi sufficienti ed adeguati alla necessità, comuni box in legno, delle dimensioni di metri 3 x 4, in grado di ospitare da 9 a 12 capretti, in numero diverso a seconda delle dimensioni del Centro, serviti da un corridoio centrale per le ordinarie operazioni di governo degli animali, dotati di porta apribile verso il corridoio centrale e delle attrezzature per la distribuzione dell'alimento.

Il know-how per la costruzione di questo tipo di box era già patrimonio di esperienza consolidato nel corso del precedente progetto-pilota, poiché presso un allevamento di quelli che vi avevano aderito si era già attuata, anche se su scala minore, una soluzione di questo genere; attingendo a tale esperienza si è riprodotto su dimensioni maggiori tale metodo di allevamento. Per le successive necessità di allevamento dei capi dopo lo svezzamento, sono stati utilizzati i grandi box di allevamento che originariamente servivano per i bovini, e nei quali potevano essere tenuti anche tutti insieme i soggetti allevati.

Annessi alle strutture di allevamento erano disponibili pascoli recintati o comunque recintabili con recinti mobili, locali di magazzino per lo stoccaggio ed il deposito degli alimenti; normalmente presenti e immediatamente utilizzabili erano i sistemi per la fornitura di energia elettrica e rete idrica.

Il personale per la conduzione dei Centri e per il governo degli animali è stato assunto a cura e con finanziamento dei costi a carico della Comunità Montana, con modalità contrattuali e retributive a norma delle disposizioni di legge che regolano i contratti dei salariati agricoli, oppure attraverso la stipula di contratti di soccida.

Le attrezzature per il governo degli animali, così come le attrezzature per la pulizia e disinfezione periodica dei locali di allevamento sono state acquistate ed entrate a far parte del patrimonio della Comunità Montana, costituendo una dotazione permanente che è stata anche messa a disposizione degli allevatori del territorio per la profilassi igienico-sanitaria e la disinfezione dei loro allevamenti (si pensi, ad esempio, ad attrezzature tipo idropultrici a vapore, ecc.). Il colostro, il latte artificiale, i mangimi e i foraggi necessari all'alimentazione e le spese veterinarie per la cura degli animali sono stati finanziati dalla Comunità Montana, ma è stata prevista una forma di partecipazione finanziaria, sotto forma di contributo per ogni capo conferito, a carico degli allevatori interessati; tale contributo variava annualmente in base ai costi effettivi di alimentazione e spese veterinarie sostenuti.

**FASE 3** - Questa fase ha coinvolto essenzialmente gli allevatori aderenti, che sono direttamente intervenuti nella sua realizzazione. È spettato infatti ai singoli allevatori selezionare la progenie da in-

viare al Centro. Nella pratica, gli allevatori hanno assistito durante le operazioni di parto le loro capre, sottraendo immediatamente e separando dopo la nascita le caprette dalle madri, evitando lambitura ed allattamento materno, e somministrando entro 2 - 4 ore un sostitutivo del colostro.

Le modalità operative di tale pratica sono state oggetto di apposito corso tenuto agli allevatori da Veterinari pratici e che è stato ripetuto annualmente prima dell'inizio di ogni stagione dei parti agli allevatori che via via aderivano ex-novo al programma. Le caprette neonate erano immediatamente isolate dal resto del gregge e, nel breve volgere di alcune ore, trasportate, a cura dell'allevatore, al Centro, dove venivano contrassegnate singolarmente mediante sistema di marcatura e registrate su registro di carico - scarico, in modo che fosse sempre possibile individuarne l'origine e la proprietà. Nel Centro le caprette venivano sistemate nei box di allevamento, ove possibile formando box di capi appartenenti ad uno stesso allevatore. In considerazione della stagionalità dei parti, le operazioni di popolamento dei Centri si sono concluse in genere in un periodo di 25 - 35 giorni.

**FASE 4** - I controlli sierologici nei confronti della CAEV sui capi conferiti ai Centri sono iniziati a partire dall'età di 50 - 70 giorni, utilizzando i test Elisa dell'Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Torino e dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta di Torino, applicando un sistema combinato di test in serie e parallelo. I capi che reagivano positivamente erano esclusi dall'allevamento e restituiti all'allevatore proprietario. Un successivo controllo veniva ripetuto a 30 giorni dal primo sui capi che fornivano eventuale esito dubbio, ed un ulteriore esito dubbio, anche non consecutivo, faceva considerare il capo come positivo. Un secondo controllo su tutti i capi veniva effettuato all'età di 4 - 5 mesi, con le stesse modalità; infine, un terzo controllo veniva eseguito su tutti i capi immediatamente prima del rientro dei capi negli allevamenti da ripopolare, a circa 9 - 10 mesi di età.

Di tutte le operazioni di prelievo si sono occupati i Veterinari del Servizio Veterinario della ASL AT di Asti, con la costituzione di un apposito gruppo di intervento, che provvedeva alla predisposizione degli scadenziari di prelievo, alla registrazione degli interventi e alla comunicazione degli esiti degli esami di laboratorio, così da fornire dettagliate notizie sul progresso dell'iniziativa agli allevatori partecipanti.

**FASE 5** - Al raggiungimento dell'età riproduttiva, le caprette sono state presentate per l'accoppiamento mediante monta naturale a maschi geneticamente miglioratori. Ciò ha comportato il reperimento di un certo numero di soggetti adulti di elevata genealogia e di sicuro stato sanitario nei confronti della CAEV, che sono stati messi a disposizione dalla Comunità Montana prelevandoli dagli allevamenti che avevano già terminato le operazioni di risanamento o acquistandoli da allevamenti esterni in grado di fornire garanzie sanitarie adeguate, che erano comunque accertate direttamente. In questo modo le caprette rientravano negli allevamenti cui erano destinate già gravide, consentendo in tale modo di evitare da un lato che maschi di incerto stato sanitario nei confronti della CAEV potessero venire a loro contatto, e dall'altro consentire l'apporto di un miglioramento e di una variabilità genetica nei singoli allevamenti.

**FASE 6** - All'età di circa 9 - 10 mesi, gli animali erano pronti per ritornare negli allevamenti di origine per effettuarne il ripopolamento con un gregge indenne da CAEV. È stato a questo punto che si è elaborata la strategia della **"partnership tra allevatori"**, con un sistema di ripopolamento degli allevamenti del tipo "tutto vuoto - tutto pieno", che però coinvolgeva solo un gruppo di allevamenti aderenti al progetto nel corso del primo anno. Nella sostanza, poiché il numero di animali allevati nei Centri nel corso di una annata non era sufficiente a ripopolare in una volta sola tutti gli allevamenti aderenti, nel corso del primo anno di esecuzione del progetto solo una parte degli allevamenti ha ricevuto i capi esenti CAEV per sostituire tutto l'effettivo infetto con capi indenni.

Questi allevamenti hanno portato a termine, circa 3 settimane prima di ricevere i capi indenni dai Centri, l'invio di tutto il "vecchio" gruppo di animali al macello, un vuoto sanitario con ripetute operazioni di pulizia, disinfezione e ristrutturazione delle strutture di allevamento, dopo di che sono stati ripopolati con gli animali esenti da CAEV provenienti dai Centri.

Gli allevatori primi beneficiari dal progetto, così come i successivi e tutti quelli che hanno in seguito aderito al programma, hanno assunto l'obbligo, per i tre anni successivi a quello in cui hanno ricevuto gli animali indenni, di fornire ai Centri un certo numero di caprette nate dalla progenie indenne, al fine di consentire agli altri allevatori partecipanti al progetto di essere a loro volta messi nella condizione di liberarsi dall'infezione con lo stesso sistema di intervento.

Gli allevamenti risanati sono stati ricontrollati per tre volte all'anno nei primi due anni, per due volte all'anno nei successivi tre anni ed infine, se mantenutisi esenti, una volta all'anno per tutti gli anni a seguire. Nel caso di riscontro di positività agli esami sierologici negli allevamenti già risanati, oltre all'eliminazione immediata del capo o dei capi risultati positivi, si procedeva ad un ravvicinamento dei controlli sierologici, che potevano essere eseguiti a distanza di 60 giorni, fin tanto che, per tre volte consecutive, tutti i capi mostravano esito favorevole; da quel momento la scansione dei controlli riprendeva con la regolare periodicità sopra menzionata.

**FASE 7** - L'operazione descritta, ovviamente con modalità via via più o meno modificate e migliorate a seguito dell'esperienza acquisita e dei risultati ottenuti, è stata ripetuta anno dopo anno, ed è tuttora in corso, coinvolgendo sempre nuovi allevamenti, anche di realtà vicine e non appartenenti alla Comunità Montana Langa Astigiana - Val Bormida: il quarto Centro di Allevamento è infatti sorto, nel 2000, nella Comunità Montana "Valle Erro, Orba e Bormida di Spigno", in provincia di Alessandria, orograficamente gemella della Comunità Montana "Langa Astigiana - Val Bormida", con lo scopo di implementare il sistema di intervento in una realtà territoriale simile per tradizione casearia e cultura zootecnica. Il sistema ha consentito di coinvolgere la totalità degli allevamenti caprini di medio - grandi dimensioni e di raggiungere una diffusione anche tra gli allevamenti caprini di piccole dimensioni.

**OBIETTIVI DEL PROGETTO** - Gli scopi che il progetto si prefiggeva di raggiungere erano essenzialmente rappresentati:

**nel breve - medio termine:**

- creazione di un primo consistente nucleo di capi e allevamenti caprini indenni da CAEV, in grado, a loro volta, di fungere da centri di rifornimento di soggetti sicuramente indenni dalla malattia per gli allevamenti della zona;
- educazione sanitaria degli allevatori, cercando di promuovere una crescita culturale volta all'ammodernamento delle tecniche di allevamento caprino;
- produzione di materiale illustrativo sull'argomento, da poter utilizzare come mezzo di divulgazione tra gli operatori del settore;

**in prospettiva:**

- certificazione sanitaria per le greggi che hanno raggiunto e mantenuto la qualifica di "indenne da CAEV";
- eradicazione dell'infezione da tutti gli allevamenti caprini presenti nel territorio della Comunità Montana "Langa Astigiana - Val Bormida";
- divulgazione del metodo di eradicazione applicato in questa realtà, mettendo a disposizione il know-how tecnico - applicativo per altre Comunità Montane, Enti, Associazioni di categoria ed allevatori interessati.

**RISULTATI OTTENUTI** - I risultati che, allo stato attuale, si sono ottenuti vengono esposti nella Tabella 2.

Accanto a questi risultati diretti se ne devono annoverare alcuni altri, che rappresentano sviluppi sia direttamente che indirettamente collegati alla conduzione del progetto:

- è stata realizzata, nel 2002 a cura della Comunità Montana, una struttura di allevamento completamente nuova, in grado di ospitare 500 capi, che rappresenta il consolidamento dell'esperienza

**Tabella 2** - Risultati ottenuti con l'utilizzo dei Centri di Allevamento (al 31/12/2009).

Centri di allevamento attivati	1
Allevatori che aderiscono al progetto	159
Capi complessivamente allevati nei Centri (1998 - 2009)	10.548
Capi allevati nel 2009	665
Capi adulti sieronegativi	5273
Allevamenti qualificati (da 2 prove negative a superiore)	134
Allevamenti in attesa di qualifica	15
Capi commercializzati con qualifica	3748

maturata attraverso la realizzazione dei Centri di Allevamento, specificamente destinata ad essere un punto di riferimento per tutta la realtà locale; attualmente costituisce una vivace entità produttiva al servizio di allevatori, veterinari, e tecnici delle associazioni di categoria che operano in zona; dispone di una sala per meetings e conferenze, e viene utilizzata anche come azienda zootecnica per attività didattiche e visite guidate;

- sono nate iniziative, collegate con il locale presidio Slow Food della Robiola di Roccaverano, che valorizzano, qualificano e contraddistinguono ulteriormente le produzioni caprine locali;
- si è assistito all'incremento del patrimonio caprino, con l'apertura di nuovi insediamenti zootecnici da parte di giovani imprenditori agricoli che hanno deciso di dedicarsi specificamente all'allevamento caprino e alla produzione casearia tipica del luogo;
- l'iniziativa ha varcato i confini regionali, ed attualmente la zona viene considerata, a livello nazionale, come una delle poche, se non l'unica, realtà in cui è possibile rifornirsi di capi certificati esenti da CAEV: la vendita di soggetti da riproduzione con tali caratteristiche sanitarie avviene ormai con tempi di prenotazione che vanno da uno a due anni, gli allevatori locali non riescono a far fronte a tutte le richieste che pervengono loro e ciò ha portato ulteriori benefici economici agli allevatori aderenti al progetto.

**ANALISI DEI COSTI** - La messa in opera del progetto ha comportato la predisposizione di un apposito ed adeguato finanziamento, il quale è stato curato dalla Comunità Montana attraverso l'utilizzo di strumenti finanziari e fondi collegati alle iniziative di sviluppo su base locale, regionale e comunitario a favore dei territori montani (obiettivo 5B, piano regionale di sviluppo montano, fondi specifici destinati a iniziative di sanità e sviluppo agricolo di Fondazioni bancarie, ecc.).

Sono state previste e finanziate diverse voci di spesa, di seguito considerate nel dettaglio:

- spese di allestimento dei Centri di Allevamento
- spese per affitto e conduzione delle strutture
- spese veterinarie
- spese per esami di laboratorio e ricerca scientifica
- spese per materiali di consumo
- spese varie.

Il costo globale preventivato del progetto per il primo anno di attività era pertanto stato pari a circa euro 119.000. In effetti, la valutazione è stata molto vicina al costo effettivamente sostenuto, che, a consuntivo, è stato pari a euro 121.000 circa per l'allevamento di complessivi 478 capi: il costo medio per capo è stato pertanto di poco meno di euro 254 circa. Ogni allevatore, inoltre, ha versato un contributo pari a euro 41 per capo conferito, il che porta ad un costo per capo, finanziato dalla Comunità Montana, di euro 213 circa.

Il costo/capo del primo anno di attività ha evidentemente risentito delle elevate spese destinate alla realizzazione ed attivazione dei Centri di Allevamento, cosa che non si è più verificata negli anni successivi. Ciò ha determinato la diminuzione considerevole del costo/capo, come si può evincere dalla Tabella a seguire.

I costi che sono stati sostenuti vengono esposti nella Tabella 3.

**Tabella 3**

Anno	Capi allevati	Costo globale	Contributo a carico degli allevatori	Costo per capo
1998	478	Lire 235.000.000 (euro 119.000)	Lire 80.000 (euro 41)	Lire 491.00 (euro 254)
1999	513	Lire 158.000.000 (euro 81.600)	Lire 80.000 (euro 41)	Lire 310.000 (euro 160)
2000	661	Lire 177.000.000 (euro 91.400)	Lire 80.000 (euro 41)	Lire 265.000 (euro 137)
2001	680	Lire 184.000.000 (euro 95.030)	Lire 100.000 (euro 51)	Lire 270.000 (euro 139)
2002	710	Lire 211.000.000 (euro 109.000)	Lire 100.000 (euro 51)	Lire 300.000 (euro 155)
2003	694	Lire 190.000.000 (euro 98.100)	Lire 120.000 (euro 62)	Lire 270.000 (euro 139)
2004	688	Euro 104.000	Euro 70	Euro 151
2005	701	Euro 108.000	Euro 70	Euro 154

**ANALISI DEI VANTAGGI E DELLE CRITICITÀ** - Il metodo adottato presenta alcuni indubbi punti di forza e, d'altro canto, alcuni inevitabili svantaggi che devono essere evidenziati e discussi.

**Punti di forza** - *Possibilità di allevamento dei capi da rimonta in condizioni di sicuro isolamento da fonti di virus CAE.* È probabilmente il vantaggio più grande di tutto il progetto e, considerate le caratteristiche particolarmente insidiose dell'agente infettivo, si tratta di un fondamentale punto di forza. La possibilità di allevare soggetti lontano da qualsiasi rischio d'infezione si rivela un enorme vantaggio, riducendo a livello bassissimo, se non quasi inesistente, il rischio di reinfezione della prole. Questo fatto è stato dimostrato, nel corso degli anni, dal confronto tra le perdite per sieroconversione che si sono verificate negli allevamenti del piano - pilota (primi tre anni) e quelle che si sono verificate nei Centri di Allevamento nel corso degli anni di loro funzionamento (Grafici 1 e 2).

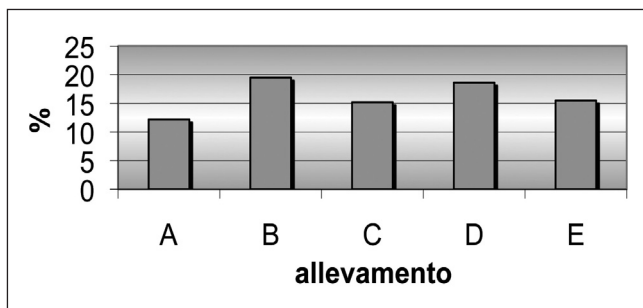
Il fatto poi che all'interno dei Centri di Allevamento siano state scrupolosamente messe in atto tutte le procedure di profilassi diretta applicabili nel caso specifico, ha consentito di ottenere ulteriori garanzie sanitarie, che sarebbero state obiettivamente impraticabili nei singoli allevamenti.

**Possibilità di eradicare/controllare contemporaneamente altre malattie.** Un ulteriore vantaggio, che si è andato evidenziando nel tempo, è stata la possibilità di eliminare dagli allevamenti che hanno aderito al progetto anche altre patologie tipiche dell'allevamento caprino, prima fra tutte la pseudotubercolosi. In effetti molti allevamenti che erano colpiti da tale patologia sono contemporaneamente riusciti, attraverso il ripopolamento con il sistema del "tutto vuoto - tutto pieno", a eliminare anche questa malattia. In alcuni casi sono anche state risolte situazioni particolarmente gravi e altrimenti non controllabili di coccidiosi.

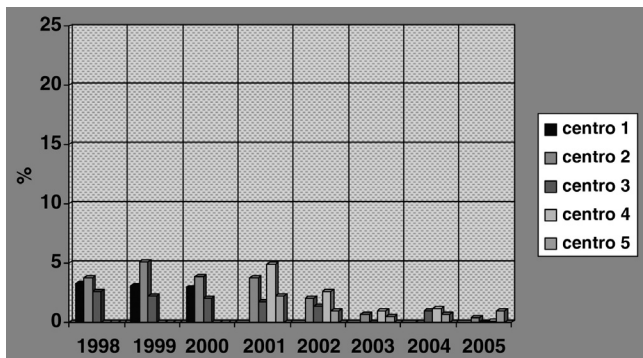
**Possibilità di creare e gestire gruppi di animali omogenei per età.** Un non secondario vantaggio è rappresentato dalla possibilità di formare gruppi di caprette da rimonta della stessa età: al di là della evidente facilitazione di gestione dei soggetti (stesso tipo di alimentazione, decornazione omogenea, svezzamento nello stesso periodo, trattamenti chemio-profilattici alla stessa età, inserimento dei maschi per la stagione di monta, ecc.), questo fatto è stato particolarmente apprezzato dagli allevatori, soprattutto in funzione della possibilità di omogenea entrata in produzione dei capi.

**Facilitazioni logistiche.** L'evidente vantaggio di raggruppare un consistente numero di soggetti in un unico posto si dimostra al momento dell'esecuzione delle operazioni di prelievo di sangue, apposizione dei contrassegni identificativi definitivi, ecc.





**Grafico 1** - Incidenza delle perdite per sieroconversione in relazione alla strategia di eradicazione in solitaria (allevamenti piano pilota 1994-97).



**Grafico 2** - Incidenza delle perdite per sieroconversione in relazione alla strategia di eradicazione con centri di allevamento (al 31/10/2005).

**Punti critici - Concentrazione in un unico luogo di soggetti provenienti da allevamenti diversi.** Si è trattato, inizialmente, di un aspetto più temuto che non reale, poiché il potenziale “rimiscelamento microbico” che si sarebbe potuto verificare attraverso la concentrazione in un unico luogo di soggetti provenienti da allevamenti diversi, e quindi portatori ciascuno di una popolazione microbica propria dell'allevamento di origine, con conseguente insorgenza di patologie problema di tipo gastroenterico e respiratorio, non si è mai verificata oltre la normale incidenza che tali patologie hanno nelle capretterie. In effetti, le perdite di soggetti per malattie intercorrenti tipiche dei giovani capretti si sono annualmente mantenute nella media del 3- 4%, né sono insorte patologie contagiose che abbiano interessato tutto l'effettivo.

**Disomogeneità fenotipica e genotipica.** È certamente l'aspetto più controverso e la criticità più evidente. Non tutti gli allevamenti aderenti al progetto partivano dallo stesso livello di selezione genetica e di tipo di razze allevate, per cui accanto ad allevamenti con capi di elevato valore genetico ed allevati in purezza si avevano allevamenti composti da soggetti frutto di incroci, di minore valore genetico e minore potenziale produttivo. Il problema è stato affrontato e parzialmente risolto attraverso la creazione di gruppi “simili per origine”: ad esempio, per il ripopolamento di allevamenti originariamente costituiti esclusivamente da soggetti di razza camosciata o alpine o saanen si sono creati gruppi di animali di tali razze destinati specificamente per quegli allevamenti, mentre per il ripopolamento degli allevamenti composti da soggetti di razze “miste” o incroci, si sono creati gruppi di tale genere. Allo stato attuale, tuttavia, questa rimane la principale criticità irrisolta.

**RISULTATI ZOOTEKNICI** - Uno studio effettuato nel quadriennio 1999-2002 (Moroni, Cavanna e Rinaldi - Fac. Med. Vet. - Milano) confrontando un campione di 2721 capi sieronegativi con un campione di 3954 capi sieropositivi ha dimostrato che:

- gli animali mantenuti sieronegativi nell'arco di 4 anni hanno avuto una produzione superiore con un valore medio di 0,15-0,30 l/die di latte in più rispetto alle positive: nei primi 90 giorni

di lattazione queste differenze si mantengono statisticamente significative ( $p < 0.0001$ ) solo per le pluripare, mentre oltre i 90 giorni di lattazione anche le primipare superano in produttività le coetanee sieropositive;

- il tenore proteico risulta compreso tra 3,03%-3,19% nei capi sieronegativi in confronto al 2,93%-3,13% dei capi sieropositivi;
- il tenore lipidico risulta compreso tra il 3%-3,33% dei capi sieronegativi in confronto al 3,02%-3,41% dei capi sieropositivi;
- il lattosio è risultato compreso tra il 4,61% - 4,72% dei capi sieronegativi in confronto al 3,69% - 4,31% dei capi sieropositivi;
- le cellule somatiche erano comprese tra 553mila - 555mila nei capi sieronegativi in confronto a 564mila - 612mila dei capi sieropositivi.

**STRATEGIA DI ERADICAZIONE ATTUALMENTE APPLICATA** - La strategia di eradicazione dell'infezione CAEV elaborata nel corso del programma si fonda essenzialmente sui seguenti 5 punti:

**1) Utilizzo di centri comuni di allevamento** - Come fin qui evidenziato, la scelta di appoggiare il programma all'utilizzo di *centri comuni di allevamento* si è rivelata, nella realtà locale, di gran lunga la migliore soluzione dal punto di vista del costo/beneficio.

**2) “Tutto vuoto/tutto pieno” negli allevamenti aderenti** - La formula del “one shoot only” si è rivelata essenziale per stabilizzare il risultato dell'eradicazione della CAE negli allevamenti aderenti.

**3) Esami sierologici periodici negli allevamenti risanati** - La periodicità dei successivi controlli negli allevamenti sottoposti ad eradicazione nei confronti della CAE (una, due o più volte l'anno, a seconda delle necessità individuali) rappresenta un punto cruciale ai fini del controllo del mantenimento dello “status sanitario” acquisito.

**4) Compartimentalizzazione degli allevamenti risanati** - Gli allevamenti aderenti operano TUTTI secondo un sistema di gestione della biosicurezza COMUNE, poiché contengono una sottopopolazione con uno stato sanitario DISTINTO rispetto agli allevamenti che non aderiscono al piano. Questo passaggio si rivela essenziale, perché insegna agli allevatori a lavorare in modo “proattivo”, anziché nel classico e superato modo “reattivo”.

**5) Contributi economici selettivi** - È stato stipulato, con gli Enti interessati (Assessorati all'Agricoltura della Regione Piemonte, della Provincia di Asti, l'Associazione Provinciale Allevatori) un accordo che fin dal 2004 prevede la concessione di contributi economici agli allevamenti caprini di nuova costituzione SOLO se i CAPI ACQUISTATI sono CERTIFICATI ESENTI DA CAEV. Questo è un altro passo essenziale al fine di prevenire, per quanto possibile, le reinfezioni virali.

#### SITUAZIONE “IN PROGRESS”

**Gli aspetti positivi** - Gli aspetti positivi, dal punto di vista epidemiologico, si possono riassumere come segue:

1994 - circa 90% capi sieropositivi e 95% allevamenti sieropositivi  
2009 - circa 89% capi sieronegativi e circa 86% allevamenti sieronegativi di cui:

- 36% (60 allevamenti) da 4 o più di anni
- 36% (59 allevamenti) da almeno 3 anni
- 21% (34 allevamenti) da almeno 2 anni
- 7% (11 allevamenti) da almeno 1 anno.

#### Gli aspetti negativi

- **Otto allevamenti** che erano risultati totalmente sieronegativi a numerosi controlli si sono in seguito ripositivizzati senza apparente motivo nel corso degli anni, con alternanza di controlli negativi seguiti da sieropositività isolate; i proprietari hanno poi rinunciato e sono usciti dal programma di eradicazione;
- necessità di tenere sempre alta la “tensione” ed il livello di guardia con gli allevatori, che tendono con il tempo ad allentare le misure di profilassi diretta;
- assenza di una metodica standard ed uniforme a livello nazionale e comunitario per l'esecuzione degli esami sierologici;
- assenza di una legislazione a livello regionale (in itinere in Piemonte), a livello nazionale (di là da venire) e comunitaria (trop-

po debole) che garantisca la qualifica degli animali oggetto di scambi commerciali ed incentivi il controllo e l'eradicazione della malattia.

**CONCLUSIONI** - Il metodo di eradicazione applicato ha consentito, nel corso degli anni della sua applicazione, di ottenere risultati notevoli nel miglioramento sanitario, zootecnico e manageriale degli allevamenti caprini coinvolti, soprattutto se si guarda alla disastrosa situazione storica di partenza.

Il progetto ha rappresentato e rappresenta, nella realtà locale, un innovativo metodo di lotta all'infezione da CAEV: a tutt'oggi esso prosegue, pur subendo, di anno in anno, modifiche strategiche e ge-

stionali conseguenti alle migliorate condizioni sanitarie degli allevamenti aderenti, all'evoluzione delle conoscenze scientifiche in materia, alle problematiche di volta in volta emergenti, alle disponibilità delle risorse finanziarie.

Deve essere comunque tenuto ben presente che questo metodo non vuole assolutamente rappresentare il “gold standard” in tema di eradicazione della CAEV, ma esclusivamente un'applicazione di un'idea innovativa che si è rivelata vincente in un particolare contesto locale: si ritiene, tuttavia, che esso possa essere opportunamente impiegato in qualsiasi realtà dell'allevamento caprino, adattandolo ovviamente alle necessità e situazioni locali.

## Recenti acquisizioni in tema di lentivirus dei piccoli ruminanti



**S. ROSATI**

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia e Ecologia, Università di Torino  
Via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO)

I lentivirus dei piccoli ruminanti sono un gruppo di virus eterogenei dal punto di vista genetico, antigenico e biologico.

Due prototipi sono ben caratterizzati dal punto di vista clinico: il virus Maedi Visna (genotipo A), originariamente descritto nelle pecore e responsabile di polmonite interstiziale, leucoencefalomielite, mastite interstiziale, artrite ed il virus della Artrite-Encefalite caprina (genotipo B), agente di artrite, mastite, leucoencefalomielite. Oggi esistono sufficienti elementi per considerare questi virus ospite adattati ma non più ospite-specifici. Sempre più frequentemente infatti vengono identificati stipiti MVV-like nelle capre (es.: Svizzera) e stipiti CAEV-like nelle pecore (es.: Francia, Italia, Spagna). Inoltre il gruppo dei lentivirus dei piccoli ruminanti comprende ad oggi almeno 5 genotipi (indicati con le lettere da A ad E) alcuni dei quali cosmopoliti (A e B), altri caratteristici di alcune aree geografiche: genotipo C in Norvegia, genotipo D in Svizzera e Spagna, e genotipo E in Italia. Dal momento che quest'ultimo genotipo presenta delle caratteristiche del tutto peculiari, lo scopo di questa nota è di fornire una sintesi degli studi più recenti sulle proprietà genetiche, antigeniche e biologiche di questo cluster virale italiano.

Il genotipo E è stato identificato per la prima volta in uno studio del 2006 nella provincia di Asti, in un gruppo di capre di razza autoctona (razza di Roccaverano). Lo scopo di quella ricerca era di valutare in allevamenti misti quali genotipi fossero implicati nella trasmissione interspecie. Lo sviluppo di un test di amplificazione genica, basato su primers degenerati in grado di amplificare tutte le varianti virali fino ad allora note, consentì l'amplificazione di frammenti del gene gag con sequenze filogeneticamente molto distanti da quelle tradizionali (similarità inferiore al 70% rispetto agli altri genotipi di riferimento). L'analisi antigenica del gene gag confermò che tutti gli epitopi utili dal punto di vista diagnostico erano differenti dalle sequenze dei ceppi classici e che l'infezione di questo nuovo cluster filogenetico era solo parzialmente svelabile dai test diagnostici tradizionali. Lo sviluppo di antigeni ricombinanti omologhi ha consentito una ricerca più approfondita di ulteriori focolai di infezione. Nell'astigiano l'infezione da genotipo E è limitata ad alcune decine di capre di razza Roccaverano con una scarsa o nulla tendenza a diffondere per via orizzontale. L'infezione si mantiene in alcune linee familiari e si trasmette esclusivamente per via lattogena. Il primo isolato virale (ceppo Roccaverano) è stato ottenuto mediante espunti di mammella, linfonodo sopramammario e milza da un soggetto asintomatico di 7 anni sieropositivo verso l'antigene omologo. La sequenza completa del ceppo Roccaverano ha rivelato due delezioni nel genoma: una corrispondente alla subunità dUTPase del gene pol e l'altra corrispondente al gene accessorio vpr-like. Tali delezioni sembrano conferire al genotipo E una ridotta virulenza, tanto che gli allevatori della zona con conoscevano le forme cliniche associate alle infezioni da lentivirus prima della introduzione di razze francesi negli anni ottanta, notoriamente portatrici dei ceppi CAEV classici. Va detto inoltre che la razza di Roccaverano ha rischiato l'estinzione negli anni settanta, quando non si contavano più di un centinaio di capi. È quindi plausibile che, con il proprio ospite, anche il patogeno sia passato in un collo di bottiglia, attenuando da un lato la sua virulenza e garantendosi dall'altro lato il passaggio alla successiva generazione per via lattogena. Un se-

condo cluster di infezione è stato identificato in Sardegna nelle capre di razza sarda. Questa volta si tratta di numeri sicuramente più importanti. Attraverso un esame sierologico applicato al latte di massa, si stima infatti che l'infezione sia presente in più della metà degli allevamenti caprini sardi, coinvolgendo più di centomila capi infetti. Attraverso la sequenza completa del genoma di un ceppo sardo (stipite Seui), si sono confermate le delezioni del genoma che rappresentano quindi un marker genetico specifico del genotipo E. Il potenziale patogeno del cluster virale sardo, invece è ancora dibattuto. Se è vero infatti che la popolazione caprina sarda può aver mantenuto un certo grado di virulenza dei ceppi, data la sua consistenza, è altrettanto vero che ceppi ottenuti da espunti di tessuti target in animali sintomatici (articolazione o mammella) non sono ancora disponibili. Quel che sembra certo è che la pecora di razza sarda non risulta recettiva all'infezione confermando che il genotipo E risulta ad oggi l'unico lentivirus strettamente ospite specifico in condizioni naturali.

Ulteriori indagini in vitro ed in silico, hanno inoltre chiarito alcune caratteristiche di questo interessante genotipo di lentivirus caprino. Il ceppo Roccaverano replica esclusivamente in linee di macrofagi di derivazione sanguigna, mentre la replicazione in fibroblasti di sinovia è limitata od assente. Il ceppo Seui invece replica in entrambe le linee cellulari, producendo sui fibroblasti il caratteristico effetto citopatico di tipo sinciziogeno. La capacità di un lentivirus, deletto per dUTPase, di replicare su cellule differenziate non in replicazione (es.: macrofagi) è il primo risultato sorprendente. È stato dimostrato in altri modelli di lentivirus che l'assenza di dUTPase produce un eccessivo accumulo di mutazioni G verso A, che risultano deleterie per la fitness virale. È possibile che l'espressione di sequenze retrovirali endogene nei macrofagi caprini fornisca il substrato enzimatico necessario a garantire una certa fedeltà nella retrotrascrizione. Studi retrospettivi su campioni di latte ottenuti nel corso di 10 anni da soggetti di razza Roccaverano confermano che il tasso evolutivo di questo virus è comparabile a quello degli stipiti dUTPase+.

Ancora più sorprendente risulta l'incapacità del ceppo Roccaverano di replicare in modo efficiente in cellule fibroblastiche, che rappresentano invece un substrato idoneo per tutti i lentivirus dei piccoli ruminanti. Inizialmente si è ipotizzato che questa restrizione fosse legata alla assenza di fattori di trascrizione cellulari. L'analisi dell'espressione di un gene reporter sotto il controllo per promotore virale ha invece dimostrato che la regione U3 dell'LTR virale è attivo in tutti i substrati cellulari testati, inclusa la membrana sinoviale. Recentemente lo sviluppo di pseudotipi virali con l'envelope dei virus Roccaverano e Seui ha consentito di chiarire che il ristretto tropismo del ceppo Roccaverano è legato alla mancanza di un recettore idoneo all'ingresso del virus nei fibroblasti. Ulteriori indagini infine suggeriscono che i macrofagi attivati per via classica, mediante stimolazione con IFN-gamma, non rappresentano un substrato idoneo alla replicazione del ceppo Roccaverano, a differenza di quanto accade per i ceppi CAEV-like, la cui replicazione risulta invece aumentata. Questo dato, una volta confermato con ulteriori prove sperimentali potrà fornire la base biologica della scarsa patogenicità del ceppo Roccaverano, rappresentando inoltre un utile



modello per lo sviluppo di ceppi vaccinali attenuati da impiegare in alternativa ai piani di eradicazione.

Un ultimo aspetto particolarmente intrigante è legato all'origine di questo genotipo. Il cluster di Roccaverano deriva chiaramente dal cluster sardo e sembra che l'ancestrale si possa collocare con buona approssimazione intorno al 1840, durante il Regno di Sardegna, con un legame storico e geografico convincente. Molto più antico sembra essere l'arrivo in Sardegna del ceppo originario. Le delezioni del genoma suggeriscono un'origine antica, forse risalente al popolo dei navigatori che, spingendosi verso occidente, colonizzarono le

isole del mediterraneo circa 5000 anni fa. Una parziale conferma deriva dalla recentissima caratterizzazione di un nuovo sottotipo di lentivirus nelle pecore di razza sarda che presenta analogie con isolati virali identificati in allevamenti di pecore presenti in Turchia, da dove si pensa origini l'antico "popolo del mare".

In conclusione il nuovo genotipo E rappresenta un eccellente modello per lo studio della co-evoluzione ospite/patogeno; le caratteristiche antigeniche lo rendono sierologicamente differenziabile dai ceppi tradizionalmente più virulenti consentendo azioni mirate e specifiche per il controllo ed eradicazione dei genotipi classici.

**Innovazioni nel campo  
della genetica molecolare  
e nuovi approcci  
metodologici:  
prospettive  
per il miglioramento  
genetico  
dei piccoli ruminanti**

# Il progetto SelMol: risultati nelle specie ovina e caprina



L. RAMUNNO<sup>1</sup>, A. CARTA<sup>2</sup>, P. CREPALDI<sup>3</sup>, L. FONTANESI<sup>4</sup>, F. PANELLA<sup>5</sup>, F. PILLA<sup>6</sup>, A. NARDONE<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici (Na)

<sup>2</sup> Agenzia Regionale per la Ricerca in Agricoltura - Sardegna

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>4</sup> Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università degli Studi di Bologna

<sup>5</sup> Dipartimento di Biologia Applicata-Sezione di Scienze Zootecniche, Università Studi di Perugia

<sup>6</sup> Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso

<sup>7</sup> Dipartimento di Produzioni Animali - Università degli Studi della Tuscia (Viterbo)

**Parole chiave:** *Capra hircus*, *Ovis aries*, selezione, biologia molecolare.

Nel 2007 si è dato avvio ad un rilevante progetto nazionale di durata triennale finalizzato al miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico denominato SelMol<sup>1</sup>. Il Progetto ha come obiettivo quello di realizzare un modello organico ed integrato tra le conoscenze di genetica molecolare e quelle tecniche-operative degli schemi di selezione animale al fine di validare sperimentalmente le conoscenze acquisite a sostegno del progresso genetico delle produzioni animali. Il progetto è articolato in linee di ricerca mirate all'introduzione di marcatori molecolari nella selezione corrente e/o per nuovi caratteri; alla selezione di genotipi particolari per geni che migliorano le produzioni quantitativo-qualitative e i caratteri funzionali, allo sviluppo di sistemi per la caratterizzazione genomica, trascrittomica e proteomica dei tipi genetici e dei loro prodotti. Il progetto prevede l'implementazione di metodiche già di patrimonio delle UO coinvolte, quali l'integrazione di marcatori molecolari e QTL negli schemi di selezione, lo sviluppo di diagnostica ad alta processività per l'analisi di Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Di seguito si riportano i principali risultati conseguiti per la produzione del latte, distintamente per la specie caprina ed ovina, per la produzione della carne per la specie ovina e per la rintracciabilità di prodotti di entrambe le specie.

## 1. LATTE

**1.1 Specie caprina - 1.1.1 Caseine** - La capra rappresenta, tra le specie di interesse zootecnico, un esempio quasi unico di variabilità nell'espressione dei geni *CSN1S1*, *CSN2* e *CSN1S2* che codificano per le caseine calcio-sensibili  $\alpha$ s1,  $\beta$  e  $\alpha$ s2. A ciascuno dei *loci* sono stati individuati alleli associati a rilevanti differenze nel livello di espressione influenzanti le caratteristiche fisico-chimiche, tecnologiche ed organolettiche del latte (Mahè *et al.*, 1994; Chianese *et al.*, 1993). Il polimorfismo della caseina  $\alpha$ s1,  $\beta$  e  $\alpha$ s2 caprina è dovuto alla presenza di alleli associati ad almeno 4, 2 e 3 diversi livelli di sintesi, rispettivamente. In particolare per tutti e 3 i *loci* sono stati individuati alleli associati a un contenuto nullo della corrispondente proteina. A tutt'oggi sono noti gli eventi molecolari responsabili di tali alleli e sono state messe a punto meto-

diche molecolari per una corretta genotipizzazione degli individui (Ramunno *et al.*, 2001, Cosenza *et al.*, 2007, 2008). Sulla base di queste conoscenze, in collaborazione con AssoNaPa è stata condotta una indagine su 289 campioni individuali di DNA estratto da pelo/sangue di becchi di razza Camosciata (57), Saanen (45), Nicastrrese (102), Aspromontana (40), Maltese (8), Grigia (19), Capestrina (9), Bianca (9). I risultati dell'indagine hanno evidenziato per le razze Camosciata, Nicastrrese, Aspromontana, Maltese, Grigia, Capestrina e Bianca un'alta frequenza (tra 0,61 e 0,67) di alleli associati ad un alto contenuto di caseina  $\alpha$ s1. Fa eccezione la razza Saanen che, di contro, si caratterizza per un'alta frequenza di alleli associati a basso (0,50) ed intermedio (0,26) e contenuto di caseina  $\alpha$ s1. Per tutti e tre i *loci* investigati la presenza di alleli nulli è risultata rara o assente.

**1.1.2 Grasso** - Anche la componente lipidica del latte ha una grande importanza sia per le caratteristiche nutrizionali e aromatiche che conferisce al prodotto, sia per le implicazioni di ordine tecnologico legate alla sua conservazione e trasformazione. Tra i geni candidati per le variazioni quali quantitative del grasso nel latte per la specie caprina sono stati presi in esame: l'Acetil CoA carbossilasi  $\alpha$  (*ACACA*), Fatty acid synthase (*FASN*), Lipoprotein lipase (*LPL*), Diacylglicerolo acil transferasi 1 (*DGAT1*) e Stearoyl CoA denaturasi (*SCD*). In collaborazione con AssoNaPa e LGS sono stati raccolti i campioni biologici di 549 animali appartenenti a 12 razze caprine allevate in Italia (Camosciata delle Alpi, Saanen, Maltese, Sarda, Nicastrrese, Aspromontana, Orobica, Bionda dell'Adamello, Valdostana, Derivata di Siria, Molisana, Garganica). Inoltre sono stati raccolti gli indici genetici (EBV, estimated breeding values) per grasso (kg e %), proteine (kg e %), latte (kg) e merito totale di 80 becchi di razza Camosciata delle Alpi, Saanen e Maltese. In totale sono stati evidenziati 25 SNP, dei quali solo 7 già noti in letteratura (Yahyaoui *et al.*, 2003; Angiolillo *et al.*, 2007; Badaoui *et al.*, 2007). Per quanto riguarda le analisi di associazione, 4 SNP (*ACACA*ex45\_CT, *ACACA*ex14\_CT, *FASN*int16\_CT, *LPL*int7\_CT) hanno mostrato una associazione significativa con l'EBV per i kg di grasso, mentre 2 SNP (*ACACA*ex45\_CT e *ACACA*ex46\_2CT) con gli EBV per la % in grasso. Di questi però soltanto lo SNP nell'esone 45 del gene *ACACA* ha mostrato un effetto significativo ( $P < 0,037$ ) in entrambe le razze per il contenuto in grasso, con un effetto di sostituzione allelica negativo per l'allele minore. Lo SNP osservato nell'introne 16 del gene *FASN* presenta l'effetto significativo più elevato ( $p = 0,006$ ) per l'allele maggiore nella razza Saanen. Anche lo SNP individuato nell'introne 7 del gene *LPL* ha mostrato un effetto significativo sul contenuto in grasso e l'allele maggiore osservato in questa razza avrebbe un effetto di sostituzione negativo. Sulla percentuale di grasso lo SNP

<sup>1</sup> Acronimo di "Selezione Molecolare", finanziato al CRSA (Consorzio di Ricerca e Sperimentazione per gli Allevatori) dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (Mipaf). Coordinatore: prof. Alessandro Nardone dell'Università della Tuscia (Viterbo).



sull'esone 46 del gene *ACACA* presenta un effetto significativo nella razza Saanen con un effetto di sostituzione allelica positivo per l'allele minore.

**1.2 Specie ovina - 1.2.2 Grasso** - Tra i geni candidati per le variazioni quali quantitative del grasso nel latte della specie ovina sono stati presi in esame i geni *SCD* e *DGAT1*. Relativamente ai fenotipi sono stati utilizzati i dati dei controlli funzionali di 100 pecore: 70 di razza Comisana e 30 di Massese. Sui campioni individuali di latte è stata condotta una analisi in HPLC che ha evidenziato una forte variabilità individuale dei parametri relativi agli acidi grassi anche a parità di fattori ambientali, suggerendo l'esistenza di una variabilità genetica corrispondente. L'analisi ha messo in evidenza 10 SNP: 2 nel gene *DGAT1* e 8 nel gene *SCD* e di questi ultimi solo 3 sono risultati polimorfici. In particolare, per lo SNP al 4° introne (A C) del gene *SCD*, la presenza della Citosina è risultata associata alla % di proteina (con un effetto di sostituzione dello 0,15%) e, per la razza Comisana anche per la quantità di latte e proteina. Lo stesso SNP è correlato al contenuto in acido oleico (C18:1 *cis* 9) ed al contenuto in acidi grassi saturi, in questo caso però l'effetto positivo era determinato dalla presenza della Adenina. Un altro SNP del gene *SCD* situato nell'introne 5 è risultato significativamente legato alla percentuale di proteina nel latte delle Comisane con un effetto di sostituzione dello 0,18%. Relativamente al gene *DGAT1* si è evidenziato che il polimorfismo nella regione 5' UT è in relazione al contenuto di acidi grassi polinsaturi (C20-5, C5, C8, C11, C14, C17) e due monoinsaturi C18:1 *trans* 10 e C18:1 *cis* 13. L'altro polimorfismo del gene *DGAT1* situato nell'introne 2, considerando insieme le due razze, ha mostrato associazioni molto significative con una serie di acidi grassi: C15, C18:1*cis*11, C11, C18:1*trans*9, C17:1*cis* 9, C18:1*trans*12.

**1.2.3 Contenuti in grasso e proteine (mediante studio di QTL)** - Al fine di meglio definire un QTL (quantitative trait locus) con effetti sui tenori in grasso e proteina nel latte di soggetti di razza Sarda (che precedenti ricerche avevano mappato sul cromosoma 7) sono state utilizzate 900 pecore back-cross (BC) Sarda per LaCaune (10 famiglie paterne e 800 pecore figlie di 18 arieti di FA e di femmine BC (BCD). Le analisi di identificazione di QTL sono state realizzate oltretutto per quantità latte (QL), grasso (QG), proteina (QP), tenore in grasso (TG) e proteina (TP) anche per due nuove variabili: quantità grasso (QGC) e proteina (QPC) corrette per la quantità di latte al fine di cogliere la capacità di produrre maggiore materia utile caseificabile a parità di quantità latte. I dati utilizzati sono stati gli indici genetici calcolati con una metodologia BLUP multi carattere e utilizzando tutte le informazioni genealogiche e produttive disponibili. La mappa genetica del cromosoma 7 è stata densificata con ulteriori 12 microsatelliti rispetto ai 6 precedenti. È stato utilizzato un approccio interval mapping applicato a un daughter design nel quale sono state cumulate le informazioni delle due popolazioni sperimentali. La lunghezza del segmento analizzato era pari al 78% dell'intero cromosoma (148.4 cM). La distanza media tra marcatori era di  $8.3 \pm 5.7$  cM con il maggior intervallo pari a 23.9 cM. In questa analisi, sono stati ottenuti picchi significativi a livello del cromosoma (P-value < 0.01) nell'intervallo tra 120.5 e 126.5 cM per tutti i caratteri originali legati alla produzione del latte. Il QTL più significativo è stato quello identificato su TG, che è risultato in segregazione in 5 famiglie. Due di queste hanno mostrato un valore LRT estremamente significativo, superiore a 18 nel punto di più probabile localizzazione del QTL. Quattro famiglie erano inoltre informative anche per TP. In questo caso, anche l'analisi di QL ha prodotto un valore significativo della statistica del test in posizione 120.5 cM. Il QTL che influenza QL è risultato in segregazione in 4 famiglie. L'insieme di questi risultati non consente al momento di programmare l'applicazione in selezione dei risultati ottenuti. L'applicazione di un DNA chip ovino 50 K potrà in futuro consentire una ulteriore localizzazione ed effetti del QTL identificato.

## 2. CARNE

**2.1 Specie ovina** - Negli ultimi anni le razze ovine in Italia si sono orientate verso due diversi indirizzi produttivi: latte e carne. Nel secondo caso il target selettivo è quello di migliorare, in agnelli di età compresa tra i 2 e i 4 mesi, gli incrementi ponderali, la conformazione e la resa al macello. L'indagine è stata condotta su 271 arieti valutati in test attitudinale, appartenenti alle razze: Appenninica (93), Bergamasca (18), Biellese (4), Gentile di Puglia (17), Laticauda (38) e Merinizzata (101) dei quali si disponeva di pesi ad età tipiche (0, 30, 45, 60, 180, 360d) e relativi incrementi ponderali, indici di performance e valutazioni morfologiche (caratteristiche di razza e attitudinali, conformazione e vello). Dopo consultazione bibliografica si sono individuati 8 SNPs in 8 geni che, per funzione, sono candidati per variazioni quantitative della carne: *IGF1*, *LEP\_2*, *MC1R\_1*, *GHR*, *GHRHR*, *GDF8*, *MEG3* e *MYH1*. Solo per i geni *GHRHR* e *GHR* (implicati nella crescita, mantenimento e peso dell'individuo) e *MEG3* (ipertrofia muscolare a livello degli arti pelvici) sono stati osservati i tre genotipi e di questi solo i primi due mostrano differenze significative tra i genotipi. In particolare, gli studi di associazione hanno evidenziato che per *GHR*, "GG" prevale su "AG" e "AA" nel peso alla nascita (5,08 vs 4,66 vs 4,56 kg), nel peso a 1 anno (68,27, vs 66,47 vs 64,16 kg) e negli incrementi da 90 a 180 d (181,99 vs 179,39 vs 163,54 g) e da 180 a 360 d (171,44 vs 166,34 vs 149,81 g). Lo SNP *GHR* ha mostrato lo stesso trend anche nell'indice di performance in cui gli arieti omozigoti "GG" hanno conseguito mediamente un indice di 0,50, quelli "AA" un indice pari a 0,43 e gli eterozigoti un indice pari a 0,45. Sempre negli indici, differenze significative sono state riscontrate per *GHRHR*, in cui "TT" (0,50) prevale su "GT" (0,37) e su "GG" (0,44).

## 3. RINTRACCIABILITÀ

**3.1 Specie ovina e caprina** - Per entrambe le specie è stata studiata la variabilità dei geni *ASIP* e *MC1R* che influenzano il colore del mantello al fine di individuare marcatori razza specifici utilizzabili in sistemi di autenticazione di alcuni prodotti monorazza oltre che per chiarire i meccanismi genetici che determinano le differenze nel colore del mantello tra razze ovine e caprine. In particolare, per il gene *MC1R* ovino sono state osservate diverse mutazioni. Di queste una (c.199C>T) è responsabile della sostituzione aa p.R67C in una posizione molto conservata della proteina e che potrebbe inattivare la sua funzione causando la produzione di pigmenti rossi. La seconda, realizzata nella regione 5'-UT (c.-31G>A) è risultata fissata nella razza Massese. Per questo motivo è stato possibile mettere a punto un sistema di autenticazione di formaggi ottenuti con solo latte di Massese (PCR-RFLP, sensibilità del 5-10%). L'analisi del gene *ASIP* ha permesso di chiarire che l'allele responsabile del colore grigio del mantello della razza Massese si caratterizza per una duplicazione completa del gene, mentre tutti gli altri genotipi producono mantello nero. Gli stessi geni sono stati indagati anche per la specie caprina. Per quanto riguarda il gene *MC1R* sono state identificate tre mutazioni missenso (p.A81V, p.F250V e p.C267W) e una mutazione non-senso (p.Q225X). Tale mutazione è quasi fissata nella razza Girgentana e, pertanto, potrebbe essere utilizzata per la messa a punto di sistemi di autenticazione di produzioni monorazza. L'analisi del gene *ASIP* ha evidenziato la presenza di alleli caratterizzati da duplicazioni in tandem del gene. La duplicazione sembra essere associata al colore bianco nelle razze Saanen e Girgentana aprendo altre prospettive per l'autenticazione di prodotti monorazza.

**CONCLUSIONI** - L'applicazione delle tecniche di biologia molecolare offre la possibilità di analizzare ed evidenziare in modo sempre più accurato la variabilità genetica esistente in natura. La presente ricerca ha permesso di identificare associazioni interessanti fra i polimorfismi genetici studiati e le caratteristiche quali-quantitative del latte e della carne. Si apre, quindi, la possibilità di utilizzare in selezione le informazioni relative a questi polimorfismi, sia per migliorare le caratteristiche sia per disporre di nuovi marcatori SNP per una maggior caratterizzazione della variabilità genetica nelle diverse popolazioni ovi-caprine allevate in Italia. Pertanto, per

mezzo della tipizzazione a livello di DNA oggi, rispetto al passato, risulta più facile ed economico ottenere gruppi di animali che producono latte o carne con caratteristiche peculiari in grado di poter soddisfare le diverse richieste del mercato.

#### ■ The project SelMol: results in sheep and goats

**Key words:** *Capra hircus*, *Ovis aries*, selection, molecular biology.

---

#### Bibliografia

- Angiolillo A. et al. (2007) J. Dairy Res. 74: 47-51.  
Badaoui B. et al. (2007) J. Dairy Sci. 90: 3012-7.  
Chianese L. et al., 1993. Lait, 73, 533-47.  
Cosenza G. et al., 2008. Small Rum. Res. 74:84-90.  
Cosenza G. et al., 2007. Anim. Genet. 38:655-8.  
Mahè M.F. et al., 1994. Genet. Sel. Evo., 26,151-7.  
Ramunno L. et al., 2001. Anim. Genet. 32:264-8.  
Yahyaoui M.H. et al. (2003) Anim Genet. 34:474-5.

# Utilizzo degli OVINE SNP50 BEADCHIP: esperienze applicative e prospettive per il miglioramento genetico



M.G. USAI, T. SECHI, SARA CASU, A. CARTA

AGRIS Sardegna - Agenzia per la Ricerca in Agricoltura, 07040 - Olmedo (SS), Italia

**Parole chiave:** SNP, genoma ovino, miglioramento genetico.

**INTRODUZIONE** - A partire dagli anni '90 la ricerca nel campo del miglioramento genetico delle specie di interesse zootecnico si è concentrata sullo sviluppo di modelli selettivi che sfruttassero le informazioni che provenivano sempre più copiose dallo studio del genoma delle specie domestiche. In particolare sono state teorizzate la selezione assistita da marcatori (MAS) o da geni (GAS) (Dekkers 2003). Tali strategie consistono nel selezionare gli animali sulla base del genotipo a loci marcatori in *linkage disequilibrium* (LD) con geni di interesse o direttamente gli animali portatori di alleli favorevoli negli stessi geni. Con queste premesse sono stati realizzati numerosi protocolli sperimentali atti ad individuare regioni del genoma associate a caratteri di interesse (QTL) o direttamente polimorfismi genici. Tuttavia, le applicazioni pratiche sono ancora scarse o limitate (Hayes et al., 2009). Il principale limite allo sviluppo di queste strategie selettive è la scarsa densità delle mappe di marcatori fino ad ora utilizzate. Per gli ovini, a partire dalla prima versione (Crawford et al., 1995), la mappa genetica ha subito progressivi aggiornamenti attraverso l'introduzione di nuovi marcatori che hanno portato ad aumentare la porzione di genoma esplorato e la densità della mappa stessa (Maddox e Cockett, 2007). La versione più recente (V 4.7) aggiornata a Dicembre 2006 (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>) è costituita da 1.470 marcatori (in prevalenza microsatelliti) che coprono una lunghezza di 3.570 cM. I protocolli sperimentali basati su questo tipo di mappe, in gran parte realizzati nell'ambito del programma di ricerca europeo "genesheepsafety", hanno consentito di identificare numerosi QTL (Barillet et al., 2005; Carta et al., 2009) caratterizzati però da ampi intervalli di confidenza, per cui non immediatamente utilizzabili in programmi di MAS. Inoltre, solo in pochi casi sono stati individuati polimorfismi su geni candidati associati a caratteri di interesse economico (Scatà et al., 2009; Miari et al., 2009). Verso la fine degli anni '90 il progredire delle tecniche di sequenziamento del genoma di diverse specie ha portato alla identificazione di decine di migliaia di *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Tali marcatori possono evidentemente essere utilizzati per densificare le mappe con le quali sono stati realizzati i precedenti protocolli sperimentali per l'identificazione di QTL e dunque consentire una maggior potenza e una maggiore precisione di localizzazione (*fine-mapping*) dei QTL individuati (Meuwissen e Goddard, 2000). L'utilizzo di mappe dense in questo tipo di protocolli può infatti consentire l'identificazione di marcatori strettamente associati al gene, e dunque utilizzabili per programmi di LD\_MAS (Dekkers, 2003), e ridurre il numero di geni candidati per posizione sui quali ricercare le mutazioni causali da utilizzarsi in programmi di GAS. Parallelamente, a partire dal lavoro di Meuwissen et al., (2001) è stata teorizzata una ulteriore applicazione di questi marcatori che consiste nella possibilità di calcolare il valore genetico degli animali come somma degli effetti sul carattere di singoli SNP o loro combinazioni. Tale approccio è conosciuto come *Genomic Selection* (GS). Di fatto essa potrebbe produrre, secondo alcune modellizzazioni teoriche (Calus et al., 2008), l'aumento dell'accuratezza nella stima del valore genetico e la riduzione del numero di fenotipi necessari (Schaeffer, 2006).

Solo recentemente, a seguito dello sviluppo degli SNP array che permettono di tipizzare decine di migliaia di SNP contemporaneamente a costi non proibitivi, in particolare del tipo chiamato Beadchip (ILLUMINA), alcune delle possibilità precedentemente menzionate iniziano a essere applicate.

Per quanto attiene il *fine-mapping*, numerose popolazioni sperimentali analizzate precedentemente con mappe sparse, fondamentalmente costituite da microsatelliti, vengono attualmente tipizzate con i BeadChip specialmente nelle specie suina e bovina. Contemporaneamente nei bovini da latte, sono in corso in diversi paesi sperimentazioni avanzate su popolazioni di migliaia di individui, in prevalenza di razza Frisona, per valutare l'applicazione della GS (Hayes et al., 2009; VanRaden et al., 2009).

Per quanto attiene più specificamente agli ovini, le sperimentazioni sono appena agli inizi, in considerazione sia del relativo ritardo con cui ILLUMINA ha messo a disposizione il BeadChip specifico sia per il suo costo ancora elevato, specialmente se si considera il valore economico del singolo capo.

Obiettivo della presente relazione è quello di tracciare lo stato dell'arte delle sperimentazioni in corso e delle prime esperienze applicative del BeadChip ovino e le prospettive che da esse scaturiscono per il miglioramento genetico degli ovini dal latte.

**OVINE SNP50 BEADCHIP (ILLUMINA)** - L'Ovine SNP50 BeadChip è stato sviluppato grazie alla collaborazione di diversi gruppi di ricerca organizzati nell'*International Sheep Genomics Consortium* (ISGC), coordinato da gruppi di ricerca della Nuova Zelanda e dell'Australia. Un primo set di SNP è stato identificato con metodo Sanger utilizzando il DNA di 9 animali appartenenti a diverse razze; ulteriori set di SNP sono stati successivamente identificati con metodo Roche 454 FLX sequenziando il DNA di 6 animali appartenenti a 6 razze e con metodo Solexa (ILLUMINA) utilizzando il DNA di 60 animali appartenenti a 11 razze diverse (Kijas et al., 2009). L'Ovine SNP50 BeadChip comprende 54,241 SNP selezionati tra quelli identificati con i metodi illustrati in precedenza sulla base di alcune caratteristiche tecniche e in particolare: compatibilità con la metodica di tipizzazione predisposta per i BeadChip; distribuzione uniforme nel genoma e frequenze alleliche sufficientemente bilanciate. Il funzionamento dei BeadChip si basa su una tecnologia relativamente semplice e veloce (Infinium II). Ciascun BeadChip è composto da 12 compartimenti, che consentono l'analisi simultanea di 12 animali. Ogni compartimento del BeadChip è costituito da "micro biglie" (3 micron di diametro) contenenti le sonde capaci di legarsi alla porzione di DNA in cui è presente lo specifico SNP. In corrispondenza del SNP si lega la specifica base complementare dotata di fluorescenza. Ogni biglia assume colore completamente rosso o verde se l'individuo è omozigote per l'uno o l'altro allele oppure un mix dei due colori se l'individuo è eterozigote. La fluorescenza viene quindi letta attraverso uno scanner e le lunghezze d'onda rilevate vengono tradotte in genotipo attraverso un confronto con una mappa di lunghezze d'onda rilevate per ogni SNP su una popolazione di riferimento.

**ESPERIENZE APPLICATIVE** - L'ISGC sta attualmente conducendo un esperimento di grandi dimensioni finalizzato a investigare la variabilità del genoma ovino in un ampio set di razze provenienti da tutto il mondo. Tale studio prende il nome di *Sheep HapMap project*



(<http://www.sheepmap.org/hapmap.php>). Nell'ambito di tale progetto sono stati tipizzati con l'Ovine BeadChip 3.400 ovini appartenenti a 74 razze diverse. Le razze analizzate provengono da Africa, Asia, Sud America, Europa, Medio Oriente, Australasia, USA e Caraibi. Gli obiettivi specifici del progetto sono molteplici. In particolare sono stati selezionati 49.034 SNP utilizzabili per analisi successive, localizzati sia nei 26 autosomi che nei cromosomi sessuali, i quali oltre a non avere alcun problema analitico hanno mostrato livelli di *Minor Allele Frequency* (MAF) superiori al 1%.

I dati relativi agli SNP ritenuti validi sono in corso di elaborazione anche per valutare la diversità genetica entro e tra razze e le relazioni esistenti tra loro attraverso le metodiche comunemente usate negli studi di filogenesi. Tali ricerche dovrebbero consentire di tracciare la storia genetica delle diverse popolazioni in relazione anche alla loro localizzazione geografica. I primi risultati mostrano una chiara struttura filogeografica delle popolazioni analizzate ovvero, una forte sovrapposizione tra i cluster ottenuti con l'analisi delle componenti principali delle distanze genetiche con le aree geografiche di origine. La ricerca di *selection signatures* cioè di regioni genomiche in cui sono particolarmente significative le differenze genetiche tra popolazioni, ha consentito di verificare che razze che presentavano manifestazioni differenti di massa muscolare e presenza/assenza di corna concentravano parte delle loro differenze genomiche in corrispondenza dei loci *Myostatin* e *Horns* sui cromosomi 8 e 10 (Kijas et al., 2010). Ulteriori informazioni sulle relazioni tra ovini domestici e ovini selvatici si potranno desumere dall'analisi di mufloni al fine di chiarire meglio il processo di domesticazione. Altri elementi di interesse per le potenziali applicazioni in selezione dell'Ovine Beadchip attengono alla misura dell'estensione del LD nelle popolazioni attraverso la misura del quadrato della correlazione tra loci in relazione alla loro distanza ( $r^2$ ; Hill and Robertson, 1968). Il livello di LD è risultato notevolmente variabile tra razze anche se generalmente minore rispetto ai bovini e maggiore rispetto all'uomo (Raadsma et al. 2010).

L'utilizzo dell'Ovine Beadchip è anche alla base di un recente programma di ricerca europeo denominato '3SR' (*Sustainable Solutions for Small Ruminants*). Esso coinvolge 14 diversi gruppi di ricerca 10 dei quali provenienti da paesi europei (Italia, Francia, Spagna, UK, Irlanda, Grecia e Polonia) e 4 da paesi extra-europei (Cina, Argentina, Australia e USA). Il progetto si propone di analizzare le informazioni genomiche di popolazioni sperimentali di ovini e caprini al fine di ampliare le conoscenze riguardo la base genetica della suscettibilità alle infezioni mastitiche, la resistenza ai nematodi, la paratubercolosi e il tasso di ovulazione. La base sperimentale è costituita in gran parte dalle popolazioni create in passato nell'ambito del progetto europeo "genesheepsafety", mirato alla identificazione di QTL con mappe sparse costituite da microsatelliti. Il primo risultato atteso dal progetto 3SR è quello di realizzare il *fine-mapping* delle regioni precedentemente identificate sfruttando il maggiore contenuto informativo dell'Ovine Beadchip.

Altri programmi in corso mirano essenzialmente alla verifica della possibilità di applicare la GS anche in popolazioni ovine. Il primo si sta realizzando in Nuova Zelanda e prevede la tipizzazione di circa 9.000 individui appartenenti a 3 diverse razze di ovini da carne (McEwan et al., 2010). In Francia è in corso un ampio programma di tipizzazione di circa 7.000-8.000 arieti appartenenti a 5 razze che dovrebbe consentire sia di realizzare il *fine mapping* di QTL precedentemente individuati sia di valutare la possibile implementazione della GS (Astruc et al., 2010).

**ESPERIENZE APPLICATIVE IN SARDEGNA** - In Sardegna presso Agris sono in corso una serie di attività, perlopiù realizzate nell'ambito dei programmi "APQ per la ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica, progetto P5a" e SELMOL e che proseguiranno nell'ambito del programma Europeo 3SR, mirate fondamentalmente a realizzare il *fine mapping* di QTL precedentemente identificati in una popolazione *back-cross* Sarda x Lacaune costituita da circa 800 individui organizzati in 10 famiglie di padri F1 (Barillet et al., 2005; Carta et al., 2002). Al momento sono stati analizzati con

l'Ovine Beadchip 635 individui di cui 9 padri F1 Lacaune x Sarda e 626 figlie *back-cross* (BC).

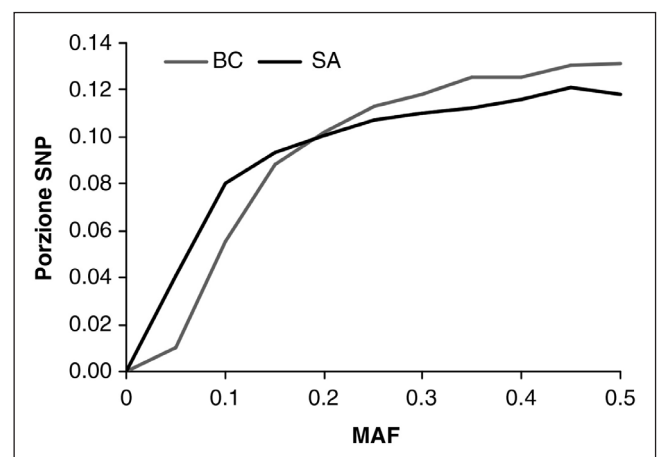
Un ulteriore campione comprendente 111 arieti (SA), iscritti al LG della razza Sarda utilizzati in fecondazione artificiale e provenienti dal Centro Arieti, è stato analizzato nell'ambito di una collaborazione con ASSONAPA e Porto Conte Ricerche. Gli arieti sono stati scelti tra quelli con maggiore impatto genetico sulla popolazione (in media 165 figlie distribuite in circa 75 allevamenti). Obiettivo della sperimentazione è quello di verificare l'informatività specifica dell'Ovine Beadchip nella razza Sarda in previsione di una sperimentazione più ampia tesa a valutare l'applicabilità della GS. Evidentemente le analisi saranno realizzate solo per i fenotipi attualmente misurati routinariamente nel LG: quantità di latte, tenore in grasso e proteine, quantità di grasso e proteine e alcuni caratteri di morfologia mammaria. I risultati delle analisi consentiranno inoltre di avviare uno studio volto a chiarire le relazioni esistenti tra la popolazione Sarda selezionata e la popolazione Sarda denominata 'Pecora nera di Arbus' (Piras et al. 2010). Quest'ultima è una piccola popolazione conservatasi in alcune aree marginali della Sardegna che non ha subito la pressione selettiva della restante parte della popolazione Sarda e ha dunque conservato alcune caratteristiche peculiari quali il vello nero, la presenza di corna e il padiglione auricolare ridotto o assente. Per tale studio è disponibile un campione di circa 20 individui di Pecora nera di Arbus tipizzato nell'ambito del progetto HapMap.

Di seguito descriveremo i primi risultati delle attività descritte in precedenza.

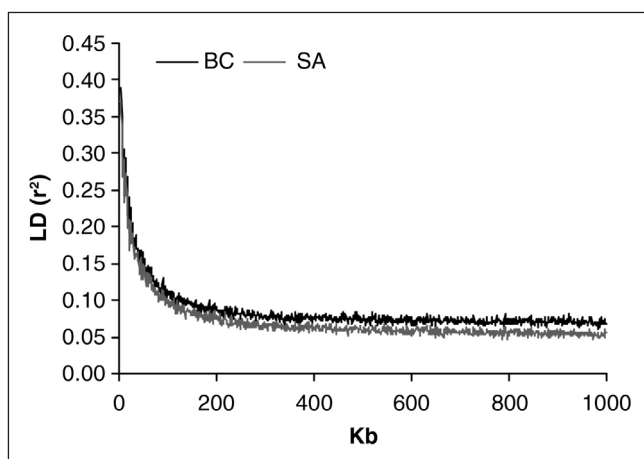
L'analisi preliminare dei dati molecolari ottenuti con l'Ovine Beadchip sulle popolazioni BC e SA ha portato all'esclusione degli SNP che: non risultavano localizzati nei 26 autosomi; hanno mostrato difficoltà analitiche su alcuni campioni; deviarono significativamente ( $P < 0,05$ ) dall'equilibrio di *Hardy & Weinberg* e presentavano un  $MAF < 0,025$ .

Gli SNP risultati utilizzabili sono stati 40.917 e 41.446 per la popolazione BC e SA rispettivamente, di cui 39.640 comuni alle due popolazioni. Questi marcatori ricoprono una porzione di genoma di circa 2.640 cM con una distanza media tra marcatori di 0,064 cM. Il numero di SNP validi, per le due popolazioni, è sostanzialmente inferiore a quello ottenuto nel progetto HapMap in quanto non sono stati inclusi gli SNP sul cromosoma X e si è applicata una soglia più rigida di MAF (0,025 contro 0,01). Il valore medio del MAF è risultato superiore nella popolazione BC (0,30) rispetto a SA (0,28). In particolare una maggior percentuale di SNP con  $MAF < 0,2$  è stata osservata in SA mentre una maggior percentuale di SNP con  $MAF > 0,2$  è stata osservata in BC (Figura 1).

I livelli di *linkage disequilibrium* misurati attraverso la statistica  $r^2$  sono risultati leggermente superiori in BC rispetto a SA, con medie di 0,08 e 0,07 rispettivamente per una distanza tra marcatori



**Figura 1** - Andamento di *Minor Allele Frequency* (MAF) nelle popolazioni *Back-Cross* (BC) e Sarda (SA).



**Figura 2** - Andamento del Linkage Disequilibrium ( $r^2$ ) nelle popolazioni Back-Cross (BC) e Sarda (SA).

di 1000 Kb. Tale differenza è risultata più accentuata per distanze superiori ai 100 Kb (Figura 2). La distribuzione di  $r^2$  in ambedue le popolazioni era in accordo con quanto osservato nell'ambito del progetto HapMap per altre razze da latte europee (Raadsma et al. 2010).

Al fine di predisporre i dati per un'analisi di identificazione di QTL nella popolazione BC è stata inoltre stimata la fase paterna per il 99,5% dei genotipi eterozigoti dei padri F1 con l'analisi *upstream* (Druet et al., 2008). A partire dalla fase paterna stimata è stato possibile individuare e localizzare le ricombinazioni avvenute durante le meiosi dei padri. Sono state identificate in media 35,6 ricombinazioni per ogni figlia. La loro distribuzione presentava una maggiore densità in corrispondenza delle regioni distali dei cromosomi rispetto alla regione centromerica. Per ciascun padre sono stati osservati in media 1074 aplotipi in cui non è avvenuta alcuna ricombinazione. La lunghezza media degli aplotipi era di 1,31 cM. Queste informazioni saranno di estrema importanza per le successive analisi di *fine-mapping*.

Sulla popolazione SA è stata eseguita una preliminare analisi di associazione tra genotipi agli SNP e gli indici genetici per la quantità di latte. Per l'analisi è stata utilizzata la procedura LASSO-LARS (Usai et al., 2009). Questa procedura, testata originariamente per la stima degli effetti al marcatore per la GS, ha la proprietà di selezionare un numero limitato di marcatori, con effetto non nullo, che spiegano una quota rilevante della variabilità genetica del carattere studiato. Nel caso della popolazione SA sono stati selezionati 45 SNP con un effetto medio di 0,055 unità di deviazione standard che spiegavano nel complesso il 72% della varianza genetica (Usai et al., 2010).

Riguardo al confronto tra la popolazione SA e il campione di Pecora nera di Arbus, è stata eseguita un'analisi basata sulla differenza media delle frequenze alleliche di gruppi di 11 SNP adiacenti (Hayes et al., 2008). Le zone con le più alte differenze (>0,35) sono state identificate sui cromosomi 3, 11, 14 e 19.

**PROSPETTIVE** - Nell'immediato le applicazioni dell'Ovine Beadchip agli ovini sembrano limitate alla realizzazione di ricerche per il *fine mapping* di QTL precedentemente identificati. Quest'ultimo approccio si avvantaggia infatti della disponibilità di popolazioni sperimentali create *ad hoc* per questi scopi in precedenti programmi di ricerca. I risultati che saranno ottenuti dalle ricerche attualmente in atto dovrebbero consentire la localizzazione precisa di QTL che potranno essere utilizzati in programmi di MAS. L'attesa riduzione del numero di geni candidati per posizione in combinazione con il notevole progresso delle tecniche di sequenziamento potrebbe inoltre accelerare l'identificazione di mutazioni causali utilizzabili in programmi di GAS.

Al contrario l'applicazione della GS sembra attualmente limitata dalla necessità, per una corretta stima degli effetti degli SNP, di po-

polazioni di riferimento di adeguata dimensione e con fenotipi rilevati precisamente nonché dall'ancora elevato costo dell'Ovine Beadchip. Come detto, al momento solo alcune razze francesi e parzialmente la razza Sarda, hanno avviato sperimentazioni mirate a valutare questa possibilità. Tuttavia, le difficoltà attuali di applicazione degli schemi di miglioramento genetico tradizionale, suggeriscono un'attenta valutazione delle possibilità che verranno offerte in futuro dall'evoluzione delle potenzialità e dei costi degli strumenti molecolari.

Tali valutazioni saranno realizzate con maggiore consapevolezza una volta disponibili i risultati dei programmi di ricerca attualmente in corso sia relativamente all'approccio *fine-mapping* che a quello Genomic Selection.

**RINGRAZIAMENTI** - Il presente lavoro è stato svolto nell'ambito dei programmi di ricerca "APQ per la ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica, progetto P5a - Attivazione del Centro di biodiversità animale per la valorizzazione del patrimonio animale con riferimento alla produzione e alla ricerca al servizio dell'allevamento" della regione Sardegna e "SELMOL" finanziato dal MIPAF.

## ■ The use of the OVINE SNP50 BEADCHIP: first applications and perspectives for the genetic improvement

**Key words:** SNP, ovine genome, genetic improvement.

## Bibliografia

- Astruc J.M., Lagriffoul G., Larroque H., Legarra A., Barillet F. (2010). In Proc. 37th Biennial Session ICAR, 31 Maggio- 4 Giugno 2010, Riga, Latvia.
- Barillet F., Arranz J.J., Carta A. (2005) Genet. Sel. Evol. 37: S109-123.
- Calus M.P.I., Meuwissen T.H.E., de Roos A.P.W., Veerkamp R.F. (2008). Genetics. 178: 553-561.
- Carta A., Barillet F., Allain D., Amigues Y., Bibe B., Bodin L., Casu Sara, Cribiu E., Elsen J.M., Fraghi A., Gruner L., Jacquet P., Ligios S., Marie-Etancelin C., Mura L., Piredda G., Rupp R., Sanna S.R., Scala A., Schibler L., Casu S. (2002). In Proc. 7th WCGALP 19-23 Agosto 2002, Montpellier. (29) 211-214.
- Carta A., Casu S., Salaris S. (2009). J. Dairy Sci. 92:5814-5833.
- Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J., Pierson C.A., Montgomery G.W., Garmonsway H.G., Beattie A.E., Davies K., Maddox J.F., Kappes S.W. (1995). Genetics 140:703-724.
- Dekkers J.C.M. (2003). EAAP Rome 2003. Book of Abstracts, 4.
- Druet T., Fritz S., Boussaha M., Ben-Jemaa S., Guillaume F., Derbala D., Zelenika D., Lechner D., Charon C., Boichard D., Gut I.G., Eggen A., Gautier M. (2008). Genetics 178: 2227-2235.
- Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. (2009). J. Dairy Sci 92:433-443.
- Hill W.G., Robertson A. (1968). Theor. Appl. Genet. 38:226-231.
- Kijas J.W. (2010). <http://www.sheepmap.org/pag.php>.
- Kijas J.W., Townley D., Dalrymple B.P., Heaton M.P., Maddox J.F., McGrath A., Wilson P., Ingersoll R.G., McCulloch R., McWilliam S., Tang D., McEwan J., Cockett N., Oddy V.H., Nicholas F.W., Raadsma H., International Sheep Genomics Consortium (2009). PLoS ONE. 4(3): e4668.
- Maddox J.F., Cockett N.E. (2007). Small Rumin. Res. 70:4-20.
- McEwan J.C., Pickering N., Dodds K., Auvray B., Johnson P., Tecofsky R., Wilson T. (2010). <http://www.sheepmap.org/pag.php>.
- Meuwissen T.H.E., Goddard M.E. (2000). Genetics 155: 421-430.
- Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. (2001). Genetics 157:1819-1829.
- Miari S., Usai M.G., Sechi T., Pernisa A., Carta A. (2009). Ital. J. Anim. Sci. 8:108-110.
- Piras M., Casu S., Salaris S., Usai M.G., Carta A. (2009). Animal Genetic Resources Information. 45:91-92.
- Raadsma H. (2010). <http://www.sheepmap.org/pag.php>.
- Scatà, M.C., Napolitano F., Casu S., Carta A., De Matteis G., Signorelli F., Annicchiarico G., Catillo G., Moiola B. (2009). Anim. Genet. 40:737-742.
- Schaeffer L.R. (2006). J. Anim. Breed. Genet., 123: 218-223.
- Usai M.G., Goddard M.E., Hayes B.J. (2009). Genet. Res., 91: 427-436.
- Usai M.G., Sechi T., Salaris S., Cubeddu T., Roggio T., Casu S., Carta A. (2010). In Proc. 37th Biennial Session ICAR, 31 Maggio- 4 Giugno 2010, Riga, Latvia.
- VanRaden P.M., Van Tassell C.P., Wiggans G.R., Sonstegard T.S., Schnabel R.D., Taylor J.F., Schenkel F.S. (2009). J. Dairy Sci. 92:16-24.



**Nuovi approcci  
nel controllo  
delle parassitosi  
degli ovini  
e dei caprini**



# Nuove strategie per il controllo degli Strongili Gastrointestinali



**G. CRINGOLI**

Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Campania, Italia

**Parole chiave:** ovini, caprini, strongili gastrointestinali, controllo.

Gli strongili gastrointestinali (SGI) dei piccoli ruminanti sono un gruppo di nematodi (*Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Bunostomum*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus*, *Chabertia* ed *Oesophagostomum*) che, elettivamente, a seconda della specie, si localizzano nell'abomaso e/o nei vari tratti dell'intestino dell'ospite.

Sono i parassiti più diffusi in ovini e caprini al pascolo (sono colpiti fino al 100% degli allevamenti e degli animali) e sono quelli che certamente provocano le maggiori perdite produttive ed economiche (Cringoli et al., 2007; Rinaldi et al., 2007). La presenza contemporanea di più generi e/o specie differenti, nella maggior parte dei casi, è all'origine di un'azione infiammatorio/traumatica e di sottrazione dei principi nutritivi che si riflette negativamente sull'accrescimento, sulla fecondità e più in generale sulla capacità produttiva degli animali. A volte si assiste alla comparsa di sintomi gravissimi, con conseguenti casi di mortalità soprattutto tra i giovani animali.

L'impatto di questi parassiti è notevole sia dal punto di vista sanitario e di benessere animale che per quanto concerne l'aspetto produttivo ed economico.

Pertanto, il controllo delle infestioni da SGI è di primaria importanza per il comparto zootecnico ovino e caprino; in Italia, esso si basa pressoché esclusivamente sull'utilizzo di antelmintici. Difatti, nella pratica quotidiana sono largamente utilizzati presidi farmacologici formulati con molecole appartenenti a gruppi chimici differenti.

La frequenza dei trattamenti antelmintici, tradizionalmente, nel centro-sud Italia, è piuttosto contenuta (Cringoli et al., 2009): i dati di una *questionnaire survey* effettuata in 227 allevamenti hanno rivelato che l'84% degli allevatori intervistati pratica interventi antelmintici, con un numero di trattamenti per anno pari a 1 (65%), 2 (28%), 3 (5%) oppure 4 (2%). Gli antelmintici utilizzati più di frequente sono risultati benzimidazolici e probenzimidazolici (49%), seguiti da lattoni macrociclici (25%), antagonisti colinergici (11%) e/o diverse combinazioni o altri antelmintici (15%). Per quanto concerne il periodo del trattamento, la maggior parte degli interventi vengono effettuati in primavera (Marzo-Aprile) e in tarda estate/autunno (Agosto-Ottobre) (Cringoli et al., 2009).

Per quanto concerne l'efficacia antiparassitaria, prove controllate di campo effettuate nel centro sud Italia, hanno evidenziato che le molecole di comune utilizzo nei piccoli ruminanti per il trattamento degli SGI (albendazolo, mebendazolo, febendazolo, oxfendazolo, netobimin, febantel, ivermectina, moxidectina) hanno prodotto valori di *Faecal Egg Count Reduction* (FECR) compresi tra 98.6% e 99.8% (Veneziano et al., 2008; Bosco et al., *present issue*). Secondo i parametri adottati dalla *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (Wood et al., 1995), gli antelmintici di cui sopra risultano pertanto altamente efficaci, oltre che sicuri.

Accanto all'efficacia parassitologica di un trattamento antelmintico,

co, è fondamentale considerare anche la sua efficacia strategica ed economica (Cringoli et al., 2007, 2008, 2009).

Recenti indagini di campo condotte in allevamenti ovini e caprini da latte in Campania, Basilicata e Molise hanno evidenziato che l'utilizzo di adeguati protocolli apporta un miglioramento delle produzioni di latte variabile dal 4% al 44% (Cringoli et al., 2007, 2008). L'efficacia economica di un trattamento non è quindi un fenomeno causa-effetto, ma multifattoriale che dipende da numerosi parametri quali: "situazione parassitologica" dell'animale in termini di specie di SGI presenti ed intensità parassitaria, virulenza della specie o del ceppo di SGI coinvolto nell'infestione, epidemiologia locale, periodo del trattamento, genetica e alimentazione dell'ospite, etc. (Cringoli et al., 2007). Tutti questi fattori devono essere presi in considerazione per comprendere questo fenomeno così complesso con il fine ultimo di mettere in atto le più corrette strategie di controllo degli SGI nei piccoli ruminanti.

Nell'ottica di ottimizzare le strategie di controllo delle infestioni da SGI, sono stati recentemente proposti a livello internazionale anche nuovi approcci sostenibili che prevedono l'utilizzo dei *Targeted Selective Treatments* (Cringoli et al., 2009) in base a cui in un gregge vengono trattati solo i capi selezionati in base a diversi indicatori parassitologici (*Faecal Egg Count*) e/o patofisiologici (FAMACHA, *Body Condition Score*, produzione di latte, etc.). Questi approcci sono stati preconizzati soprattutto nelle zone del centro e del nord Europa dove il fenomeno della antelmintico resistenza risulta ampiamente diffuso (Kenyon et al., 2009).

Per una adeguata strategia di controllo delle infestioni da SGI nei piccoli ruminanti sono necessari: una precisa diagnosi, una adeguata scelta del farmaco anche in termini di dosaggio e via di somministrazione, una precisa individuazione del periodo di trattamento coerente con la dinamica epidemiologica locale.

## Bibliografia

- Bosco A., Pintus D., Rinaldi L., Santaniello A., Santaniello M., Guariglia I., Coles G., Cringoli G., 2010. Atti SIPAOC.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Mezzino L., Vercruysse J., Jackson F., 2009. *Veterinary Parasitology*, 164: 36-43.
- Cringoli G., Veneziano V., Jackson F., Vercruysse J., Greer A.W., Fedele V., Mezzino L., Rinaldi L., 2008. *Veterinary Parasitology*, 156: 340-345.
- Cringoli G., Veneziano V., Pennacchio S., Mezzino L., Santaniello M., Schioppi M., Fedele V., Rinaldi L., 2007. *Parassitologia*, 49: 201-207.
- Kenyon F., Greer A.W., Coles G.C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret J., Berrag B., Varady M., Van Wyk J. A., Thomas E., Vercruysse J., Jackson F., 2009. *Veterinary Parasitology*, 164: 3-11.
- Rinaldi L., Veneziano V., Cringoli G., 2007. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medical Hygiene*, 101: 745-746.
- Veneziano V., Mezzino L., Santaniello A., Santaniello M., Pennacchio S., Morgoglione M.E., Guariglia I., Durante A.L., Cringoli G., 2008. *Parassitologia*, 50: 1-2.
- Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocum O., Taylor S.M., Vercruysse J., 1995. *Veterinary Parasitology* 58: 181-213.

# Il controllo degli endoparassiti negli allevamenti caprini in Lombardia: tra strategie convenzionali ed alternative



M.T. MANFREDI<sup>1</sup>, S. ZANZANI<sup>1</sup>, G. BRUNI<sup>2</sup>, K. STRADIOTTO<sup>2</sup>,  
G. ZANATTA<sup>2</sup>, M. VILLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup> Associazione Regionale Allevatori Lombardi (ARAL, Crema)

**Parole chiave:** parassiti, nematodi gastrointestinali, *Eimeria*, capra.

**INTRODUZIONE** - Nonostante l'ampia affermazione dell'allevamento caprino, le parassitosi in generale, e più in particolare quelle a carico dell'apparato gastroenterico sono ampiamente diffuse e rappresentano a tutt'oggi una problematica peculiare indipendentemente dall'indirizzo produttivo e dall'area geografica.

La Lombardia possiede un importante patrimonio caprino soprattutto dal punto di vista della biodiversità e comunque numericamente consistente seppur in misura inferiore rispetto ad alcune regioni del Meridione o dell'Italia insulare. Negli ultimi decenni in questa regione come in quelle centrali e settentrionali si è assistito ad un progressivo aumento dei capi allevati e della produzione. Infatti, nel 2006 sono state raccolte dall'industria lattiero casearia 27.203,8 tonnellate di latte caprino (46,7% in Sardegna, 13,5% nel Lazio, 10,5% in Lombardia, 9,10% in Piemonte) (ISTAT).

La Lombardia è di fatto l'unica regione del nord Italia in cui il numero dei caprini allevati risulta in costante crescita; sono presenti 53.575 capre allevate in 3.386 aziende agricole, che costituiscono circa il 38% del totale di capi allevati nel nord del Paese (Noè L. et al., 2005). Negli ultimi 35 anni il numero totale delle capre è aumentato del 3,3% (Istat, dati 2005) (Di Cerbo A.R., Manfredi M.T. et al., 2010). Si evidenzia, per altro, una diminuzione del numero di aziende a basso profilo economico e tecnico e la nascita di nuove realtà aziendali altamente specializzate, con un numero elevato di capi (S.A.T.A. A.R.A.L. 2000; Furesi R., Greppi G.F., 2002).

Gli allevamenti caprini lombardi sono collocati essenzialmente nelle province il cui territorio è prevalentemente montano (Bergamo, Brescia, Como, Sondrio e Varese), rispecchiando le caratteristiche proprie dell'allevamento caprino, che presenta importanti realtà relative sia ad allevamenti intensivi con animali ricoverati in stalla tutto l'anno, sia ad allevamenti in grado di utilizzare al meglio le risorse pascolive di aree vocate alla pratica zootecnica (Noè L. et al., 2005).

All'interno dell'allevamento caprino lombardo è possibile riscontrare accanto alle cosmopolite Saanen e Camosciata dell'Alpi, presenti in numero elevato in tutte le aree agricole europee, anche razze autoctone (la Bionda dell'Adamello, la Frisa Valtellinese, l'Orobica, la Verzaschese, la Lariana e la Ciavenasca) a minor diffusione, distribuite su tutto il territorio montano e pedemontano.

## I PARASSITI NEGLI ALLEVAMENTI CAPRINI LOMBARDI

Le parassitosi da Nematodi gastrointestinali (NGI) sono una fonte di notevoli perdite economiche nell'allevamento della capra da latte che, a differenza della pecora, non sviluppa un'efficace immunità verso i parassiti. Diversi studi hanno dimostrato che sia l'acquisizione sia l'espressione della risposta immunitaria nei confronti dei NGI è meno efficiente nella capra rispetto alla pecora (Huntley et al 1995, Pomroy et al 1986). L'acquisizione di una risposta immunitaria efficace compare in ritardo nella capra (12 mesi in confronto ai 6 mesi della pecora) (Vlassof et al 1999). Inoltre, nella capra da latte, le infestazioni da NGI hanno livelli simili tra animali adulti e giovani rispetto alla pecora in cui gli adulti sono significativamente meno infestati rispetto ai giovani.

Le infestazioni da NGI sono particolarmente diffuse nei caprini al-

levati in Lombardia, la stragrande maggioranza delle capre esaminate sono risultate positive all'esame copromicroscopico (P= 96%, 95%CI: 95,1-96,7%) per numerosi taxa. Le infestazioni sono sostenute da diverse specie di NGI in grado di colonizzare i vari tratti dell'apparato digerente e quelle che si localizzano nell'abomaso presentano i valori più elevati relativamente ai parametri epidemiologici (Tabella 1).

*Teladorsagia circumcincta* è la specie con il valore di indice di Thul più elevato e risulta il parassita dominante su tutta l'elmintofauna gastrointestinale dei caprini. Per altro, tale specie mostra delle cariche molto elevate negli animali in allevamento semiestensivo che praticano un pascolo limitato ad aree ristrette (Tabella 2). Le capre in allevamento estensivo oltre ad avere cariche inferiori manifestano, per lo meno a livello abomasale, una maggiore biodiversità el-

**Tabella 1** - Nematodi gastrointestinali dei caprini allevati in Lombardia.

Localizzazione	Specie parassita	Indice di Thul $\geq 1$	P	I	A
Abomaso	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	93,2	82,2	676,7	556,4
	<i>Haemonchus contortus</i>	6,5	46,7	147,8	69,0
Intestino tenue	<i>Nematodirus lanceolatus</i>	88,9	52,5	5,48	2,8
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	6,8	5,0	47,5	2,4
	<i>Strongyloides papillosus</i>	1,5	5,0	10,0	0,5
	<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	1,1	2,5	30,0	0,7
Intestino cieco-colon	<i>Skjabinema ovis</i>	96,3	69,2	259,1	179,3
	<i>Oesophagostomum sp.</i>	3,7	38,5	32,1	12,3

P = Prevalenza, I = intensità, A = Abbondanza.

**Tabella 2** - Nematodi gastrointestinali dei caprini allevati in Lombardia in relazione alla tipologia di allevamento.

Specie parassita	Allevamento estensivo		Allevamento semiestensivo	
	A	P(%)	A	P(%)
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	65	75	816,8	75
<i>Teladorsagia pinnata</i>	-	-	0,6	12,5
<i>Haemonchus contortus</i>	7,5	37,5	1,2	25
<i>Trichostrongylus axei</i>	2,5	25	0,65	12,5
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	0,6	12,5	1,2	25

**Tabella 3** - Specie occasionali di NGI rinvenute in capre lombarde.

Specie parassita	A	P(%)	Ospite specifico
<i>Spiculoptergia spiculoptera</i>	15	37,5	Capriolo, cervo
<i>Ostertagia leptospicularis</i>	2,5	25	Cervo, capriolo
<i>Ostertagia ostertagi</i>	0	12,5	Bovino
<i>Ostertagia mathevossiani</i>	2,5	25	--

**Tabella 4** - Escrezione di parassiti gastrointestinali dei caprini allevati in Lombardia; sono riportati i valori di prevalenza (P) e di abbondanza (A) riferiti al calcolo delle upg dei nematodi gastrointestinali.

Parassita	Indice	Media ± ds
<i>M. benedeni</i>	A	–
	P (%)	8,37±14,26
<i>Strongyloides</i> sp	A	9,32±20,92
	P (%)	15,46±21,39
Strongylida	A	212,77±505,07
	P (%)	39,66±40,01
<i>Nematodirus</i> sp	A	1,88±6,18
	P (%)	11,85±20,52
<i>Skrjabinema</i> sp	A	–
	P (%)	24,41±23,18
<i>Trichuris</i> sp	A	6,79±12,18
	P (%)	12,12±15,44
<i>Capillaria</i> sp	A	0,17±0,65
	P (%)	0,54±2,34
<i>Marshallagia</i> sp	A	0
	P (%)	0,07±0,76
<i>Eimeria</i> sp	A	–
	P (%)	91,94±17,26
Totale	A	230,94±503
	P (%)	92,03±23,55

P = Prevalenza, A = Abbondanza.

minitica dovuta alla presenza di parassiti accidentali che di norma sono rinvenuti in altre specie ospiti (Tabella 3).

Gli esami copromicroscopici effettuati su campioni prelevati da 2554 capre hanno confermato una grande diffusione degli Strongylida (P=39,6%) (Tabella 4).

Per quanto attiene, inoltre, la distribuzione dei parassiti G.I. per unità di campionamento (No. aziende=110), i coccidi (*Eimeria*) sono risultati ad elevata diffusione in tutto il territorio considerato (P=91,8%), con prevalenze a livello aziendale tra l'8,3% e il 100%. I generi *Skrjabinema*, *Strongyloides*, *Nematodirus* e *Trichuris* seppure meno comuni, hanno comunque fatto registrare localmente valori di prevalenza anche superiori al 70-80%. La presenza di *Marshallagia* e *Capillaria* nelle capre lombarde può essere considerata sporadica (prevalenze < 1%).

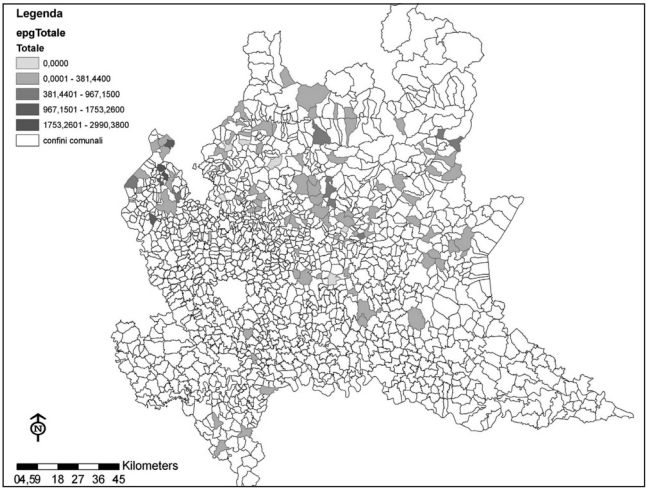
La distribuzione territoriale di *Skrjabinema*, *Strongylida* e *Moniezia benedeni* è risultata non uniforme tra le province (test di Kruskal Wallis:  $p<0,01$ ,  $p<0,01$  e  $p<0,05$ , rispettivamente), con prevalenze più elevate in quelle di Lecco, Varese e Como (Tabella 5).

In generale, i dati hanno mostrato che le capre alla prima lattazione erano significativamente più infestate da Strongylida e *Trichuris* rispetto alle pluripare (test di Kruskal Wallis, in entrambi i casi  $p<0,001$ ) e il loro contributo in termini di contaminazione ambientale e formazione del rischio parassitario sembra essere elevato (Tabella 6).

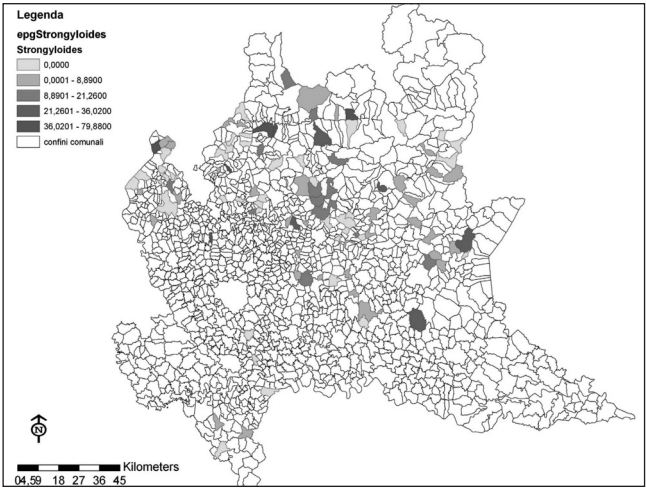
**STRATEGIE DI CONTROLLO PER I NGI** - Le strategie di controllo adottate dagli allevatori lombardi sono state desunte dalle informazioni fornite da 104 aziende tra quelle aderenti al servizio di assistenza tecnica (SATA) raccolte tramite un questionario. Dall'inchiesta è emerso che il 75,73% delle aziende intervistate pratica il

**Tabella 5** - Escrezione di nematodi gastrointestinali (upg) dei caprini allevati in Lombardia; sono riportati i valori di abbondanza (A) e d.s. riferito a ciascuna provincia.

Provincia	Strongyloides	Strongylida	Nematodirus	Trichuris	Capillaria
BG (n=876)	5,7±23,1	61,5±211,2	0,9±7,2	6,1±28,2	0,04±1,1
BS (n=454)	7,5±36,7	105,1±526,6	2,6±24,3	3,9±17,5	0,15±2,2
CO (N=218)	11,8±47,5	102,9±315,8	2,9±11,9	10,1±38,7	0,5±3,9
LC (n=144)	29,4±194,8	36,1±136,4	0,2±2,8	3,5±15,6	0,0±0,0
PV (n=103)	0,9±5,6	23,3±120,2	0,3±3,3	1,6±7,2	0,0±0,0
SO (n=327)	36,4±125,5	75,8±318,7	4,9±18,6	5,8±38,8	0,1±1,8
VA (432)	14,3±93,2	591,3±1178,6	1,0±5,7	8,8±46,5	0,3±3,2
p- value	***	***	***	n.s.	n.s.



**Figura 1** - Escrezione di uova di nematodi gastrointestinali (upg) dei caprini, la mappa coropletica riporta i limiti dei comuni lombardi.



**Figura 2** - Escrezione di uova di *Strongyloides* (upg) dei caprini, la mappa coropletica riporta i limiti dei comuni lombardi.

trattamento antelmintico annuale e di queste solo il 5,1% effettua un secondo trattamento ma in modo discontinuo. Per altro, anche il trattamento annuale non viene applicato regolarmente e non è effettuato di regola sulla base di dati oggettivi (esame parassitologico quantitativo) o quando questi sono presenti non sono stati rilevati in prossimità del trattamento (Tabella 7).

I principi attivi più frequentemente utilizzati sono i benzimidazoli e probenzimidazoli (87,65%) e i lattoni macrociclici (2,47%) (Tabella 8).



**Tabella 6** - Escrezione di uova Strongylida per stadio di lattazione e valore percentuale (n° capi=390).

Stadio lattazione	upg totale per gruppo lattazione	% upg
1	79.973,3	34,3
2	42.821,4	18,4
3	39.686,5	17,0
4	18.976,2	8,1
5	21.110,5	9,1
6	14.007,0	6,0
7-8	16.374,8	7,0

**Tabella 7** - Aziende caprine contattate mediante questionario per la raccolta d'informazioni sulle strategie di controllo dei NGI.

	N° aziende	%
BG	32	30,7
CO	13	12,5
LC	9	8,6
SO	10	9,6
BS	19	18,3
VA	21	20,2

**Tabella 8** - Antelmintici utilizzati in Lombardia per il controllo delle infestazioni da endoparassiti negli allevamenti caprini.

Prodotto commerciale	Principio attivo	N. aziende	%	Registrato in Italia per i caprini
Hapadex 5%	netobimin	20	24,7	Si
Panacur	fenbendazolo	18	22,2	No
Valbazen	albendazolo	17	20,9	No
Oxfenil 2,265%	oxfendazolo	7	8,6	Si
Rintal 10%	febantel	4	4,9	No
Gardal 1,9%	albendazolo	3	3,7	No
Elmipur	fenbendazolo	2	2,5	No
Eprinex pour-on	eprinomectina	1	1,2	No
Oramec	ivermectina	1	1,2	Si
nd		8	9,8	

Relativamente ai prodotti commerciali impiegati, il 24,7% delle aziende utilizza un prodotto registrato per i caprini (netobimin) sebbene in larga parte siano impiegati prodotti non registrati (Tabella 8). Il trattamento viene effettuato in generale tra la fine di ottobre e la prima metà di gennaio in funzione del tipo di azienda, dell'area climatica e dello stato fisiologico delle capre.

#### ANTELMINTICO RESISTENZA NEI CONFRONTI DEI NGI -

Il frequente ricorso a trattamenti antelmintici richiesto dall'allevamento caprino pone in maniera inevitabile la questione dell'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza. Segnalazioni di antelminticoresistenze nell'allevamento caprino riguardano già tutte le categorie di farmaci antelmintici attualmente in uso (Genchi, 2006), anche se la classe di farmaci che sembra essere maggiormente coinvolta è quella dei benzimidazoli (Carta e Scala, 2004). Allo stato attuale la realtà italiana appare ancora relativamente poco coinvolta da tali fenomeni: un recente studio effettuato su un allevamento caprino del Sud Italia, con una storia di ripetute introduzioni di indi-

vidui non controllati da un punto di vista parassitologico e con ripetuti trattamenti effettuati con diverse tipologie di farmaci (benzimidazolo, levamisolo e ivermectina), ha consentito di rilevare che solo una specie di nematode gastroenterico (*Trichostrongylus colubriformis*) presentava fenomeni di farmaco-resistenza nei confronti del benzimidazolo (Cringoli et al., 2007). La situazione però resta da non sottovalutare: da un lato perché la descrizione del fenomeno in Italia è frammentaria e probabilmente sottostimata (Carta e Scala, 2004), dall'altro perché a livello internazionale esistono segnalazioni di realtà molto problematiche che anche da noi potrebbero presentarsi; tali situazioni sono da considerare problematiche non solo per la frequenza di fenomeni di resistenza anche ai lattoni macrociclici e agli imidazotiazoli, ma anche per la comparsa di resistenza multispecifica e/o multipla.

In Lombardia la presenza di antelmintico resistenza è stata indagata su aziende con pascolo o di tipo semiestensivo esposte maggiormente al rischio di infestazioni da nematodi gastrointestinali. L'indagine ha coinvolto in totale 1228 capi; le capre trattate hanno subito il trattamento antelmintico secondo indicazione del veterinario aziendale. È stato quindi effettuato un primo prelievo di feci al giorno 0 e quindi un secondo dopo un intervallo di tempo dipendente dal principio attivo utilizzato (al giorno 3-7 per il trattamento con levamisolo, al giorno 8-10 per i benzimidazoli o probenzimidazoli e al giorno 14-17 per i lattoni macrociclici). È stato determinato il valore delle upg (uova/gr feci) per entrambi i prelievi (pre e post-trattamento). Quindi è stato calcolato il FECRT test utilizzando, secondo le più recenti indicazioni, 2 formule:  $iFECR2 = [100 \times (1 - (t2/t1))]$  e FORMULA DI COLES  $[100 \times (1 - (T2/C2))]$ . Entrambe restituiscono un valore percentuale che esprime l'entità dell'efficacia del farmaco e quindi della resistenza (Tabella 9).

In accordo con il valore di FECRT, gli allevamenti sono stati distinti in gruppo BZ-suscettibile (FECRT >90%), gruppo BZ-mediamente resistente (FECRT 41-64%) e gruppo BZ-altamente resistente (FECRT <40%). Lo stesso criterio è stato utilizzato per gli allevamenti che hanno utilizzato farmaci a base di un latrone macrocicli-

**Tabella 9** - Risultati del test di riduzione delle uova (FECRT) nelle greggi campionate e trattate con benzimidazoli e probenzimidazoli distinti per principio attivo e per azienda (n° capi trattati=437).

		Provincia	iFECR2 %	Formula di Coles%	FECRT medio	Principio Attivo
BENZIMIDAZOLI	1	VA	82,3	NC	NC	ALBENDAZOLO
	2	BG	83,3	97,1	90,2	
	3	BG	100,0	100,0	100,0	
	4	BG	82,7	78,9	80,8	
	5	BS	100,0	100,0	100,0	
	6	CO-LC	88,0	86,0	87,0	
	7	SO	100,0	100,0	100,0	
	8	BG	67,1	NC	NC	FENBENDAZOLO
	9	CO-LC	99,0	99,0	99,0	
	10	BG	67,1	NC	NC	
	11	CO-LC	99,0	99,0	99,0	OXFENDAZOLO
	12	BS	99,0	95,1	97,1	
	13	BS	98,4	94,4	96,4	
	14	BS	99,0	99,0	99,0	
PROBENZIMIDAZOLI	15	VA	89,6	NC	NC	NETOBIMIN
	16	VA	97,4	NC	NC	
	17	VA	87,9-98,0	NC	NC	
	18	VA	97,4	98,6	97,9	
	19	VA	96,4	NC	NC	
	20	BG	76,5	61,4	68,9	FEBANTEL
	21	BG	92,7	83,3	88,1	



**Tabella 10** - Risultati del test di riduzione delle uova (FECRT) nelle greggi trattate con lattoni macrociclici distinti per principio attivo e per azienda (n° capi trattati=175).

		Provincia	iFECR2 %	Formula di Coles%	FECRT medio	Principio Attivo
MILBEMIONE	1	VA	98,5 99,7	NC	NC	MOXIDECTINA
	2	SO	92,0	87,0	89,50	
AVERMECTINE	3	VA	99,1	NC	NC	EPRINOMECTINA
	4	BG	97,23	NC	NC	
	5	BG	74,0	86,0	80,0	
	6	BS	99,6	99,9	99,7	
	7	CO-LC	99,0	94,0	96,5	
	8	BG	96,7	NC	NC	IVERMECTINA
	9	BS	99,6	NC	NC	

co. Il valore di FECRT è stato calcolato per ogni animale trattato estrapolando poi il valore medio per gregge escludendo tuttavia gli animali con cariche particolarmente basse.

Secondo il valore di FECRT 10 allevamenti sono risultati sensibili (FECRT > 90%) ai farmaci benzimidazoli e probenzimidazoli, in 3 allevamenti potrebbe essere sospettata una forma di resistenza (FECRT < 90% ma > di 67%) e un solo allevamento può essere incluso nel gruppo moderatamente resistente (FECRT= 68,98%). Per tutti gli altri allevamenti in cui non abbiamo potuto calcolare entrambi i valori in quanto gli animali del gruppo dei controlli non sono stati distinti al 2° prelievo non è possibile dare un giudizio definitivo. In questo caso, forme di resistenza potrebbero essere sospettate in 2 allevamenti con valore di iFECR2=67,14%.

Nella Tabella 10 sono riportati i valori di FECRT delle greggi trattate con lattoni macrociclici.

Sulla base dei valori di iFECR2 tutti gli allevamenti sono risultati completamente sensibili (FECRT > 90%) ai lattoni macrociclici ad eccezione di una azienda in provincia di Bergamo in cui si potrebbe ipotizzare una forma di resistenza a queste molecole.

**IMPIEGO DEI TANNINI CONDENSATI PER IL CONTROLLO DEI NGI** - I tannini (polifenoli ad alto peso molecolare) sono metaboliti secondari di alcune piante, presenti sotto forma di composti condensati e/o idrosolubili. Sono impiegati in diversi settori commerciali, in campo zootecnico e recentemente sono state valorizzate alcune proprietà interessanti dal punto di vista veterinario. Nello specifico, ci si riferisce agli effetti nei confronti dei nematodi gastrointestinali dei piccoli ruminanti che sono classificabili in un'azione indiretta su base nutrizionale che rafforza la risposta immunitaria dell'ospite nei confronti del parassita e un effetto simil-antelmintico diretto con una riduzione della fecondità delle femmine e delle uova escrete. In aggiunta, i tannini determinano una riduzione delle flogosi intestinali; hanno un effetto astringente, con riduzione della percentuale di acqua nelle feci, miglioramento dello stato della lettiera e ripercussioni positive sul benessere animale. I tannini idrolizzabili svolgono anche un'azione regolatrice della flora intestinale e, secondo i risultati di un recente studio, sono in grado di inibire lo sviluppo di ceppi batterici intestinali.

I tannini quale metodo di controllo delle parassitosi consentono, inoltre, di ridurre l'immissione di molecole chimiche nell'ambiente, di qualificare i prodotti in termini di sicurezza a seguito del minor uso di farmaci, nonché di contenere i costi di produzione.

Nell'ambito di incontri con i tecnici dell'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (sezione caprini) in cui era emersa la problematica dell'incremento dell'entità delle endoparassitosi caprine in Provincia di Varese con maggiore rilevanza in alcuni allevamenti che prevedono il ripetersi dei medesimi circuiti di pascolo nell'arco di una singola stagione produttiva, è stata pianificata una prova sperimentale di somministrazione di un alimento arricchito

di tannini condensati. La prova è stata allestita sulla base dei dati ottenuti in greggi caprine alimentate con fieni ricchi di tannini condensati come Sulla (*Hedysarum coronarium*) o Lupinella (*Onobrychis viciifolia*) (Paolini et al 2003), ed è stata effettuata in una azienda scelta tra gli allevamenti maggiormente infestati. Le capre di razza camosciata, in lattazione, hanno ricevuto un prodotto commerciale (SILVAFEED BY PROQ - SILVATEAM) ricco di tannini condensati (70% sulla sostanza secca) estratti dalla corteccia del quebracho (*Schinopsis lorentzii*). Il quebracho è stato incluso direttamente nel mangime pellettato allo scopo di favorirne un'assunzione regolare. La scelta di somministrare il quebracho al posto dei fieni di Sulla o lupinella particolarmente ricchi di tannini è stata obbligata dal fatto che questi fieni, prodotti nelle regioni italiane centrali e meridionali, sono risultati di difficile reperibilità.

A partire dal mese di maggio, le capre dell'allevamento sono state suddivise in cinque gruppi, ed ogni gruppo, una settimana al mese per 4 mesi, ha ricevuto una differente tipologia di mangime caratterizzata da concentrazioni diverse di quebracho (2% o 4%), mentre gli altri componenti della razione non subivano variazioni all'interno dei diversi gruppi alimentari:

- **gruppo T2** (16 capre): mangime trattato con tannino condensato in percentuale pari al 2% SSI (Sostanza Secca Ingerita) da maggio a settembre;
- **gruppo T4A** (10 capre): mangime trattato con tannino condensato in percentuale pari al 4% SSI da maggio a luglio;
- **gruppo T4B** (10 capre): mangime trattato con tannino condensato in percentuale pari al 4% SSI da agosto ad settembre;
- **gruppo C** (18 capre): gruppo di controllo negativo; mangime non trattato per tutta la lattazione.

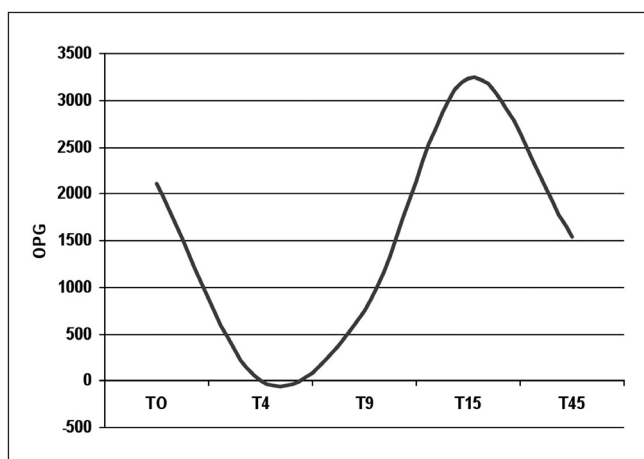
Le capre incluse nella prova un mese prima dell'inizio della sperimentazione sono state tutte trattate con un farmaco antelmintico e solo dopo aver verificato la negativizzazione parassitaria è stato somministrato il mangime trattato. Le analisi copromicroscopiche hanno evidenziato come i mangimi contenenti tannino condensato in percentuale pari al 2% e al 4% della sostanza secca ingerita abbiano favorito il contenimento dell'instaurarsi dell'infestazione da nematodi tricostrongilidi soprattutto nel gruppo T4B (upg = 38).

Dal punto di vista della produzione di latte, le medie produttive dei singoli gruppi alimentari corrette per la produzione individuale ante-prova e riguardanti il periodo maggio-agosto 2009, evidenziano come la produzione latte e la percentuale di lattosio nel latte non siano state influenzate dalla presenza di tannino condensato nel mangime, a differenza del tenore lipidico e proteico che sono aumentati nel latte prodotto da capre alimentate con mangime contenente tannino condensato in percentuale pari al 2% della sostanza secca ingerita.

Questi risultati sono stati abbastanza sorprendenti, poiché oltre ad un miglioramento della percentuale lipidica e proteica nel latte era atteso, più per effetto indiretto di diminuzione del numero di parassiti presenti che per effetto diretto, anche un aumento della produzione latte, soprattutto in quelle capre alimentate con mangime contenente tannino condensato in percentuale pari al 4% della sostanza secca ingerita.

#### IMPIEGO DEI TANNINI CONDENSATI PER IL CONTROLLO DEI COCCIDI

I protozoi del genere *Eimeria* hanno una diffusione capillare negli allevamenti caprini lombardi e comprendono specie sia patogene sia non patogene. Alcune specie di *Eimeria* tra quelle che frequentemente infettano i caprini possono sporulare anche in un solo giorno e il periodo di prepatenza è piuttosto breve (7 giorni per *E. aljevi*). L'infezione specialmente nei capretti è presente con prevalenze molto elevate (oltre il 90%) ed è accompagnata da gravi manifestazioni cliniche quanto più gli animali sono in giovane età. Quest'ultimi presentano anche le cariche più elevate. La comparsa di forme cliniche è influenzata da differenti fattori quali l'intensificazione della produzione, lo stato immunitario degli animali e le condizioni climatiche (Ruiz et al 2006). In capretti provenienti da un allevamento intensivo lombardo ben il 23,6% dei soggetti aveva cariche  $\geq 50.000$  oocisti che è considerato il livello di



**Figura 3** - Valori di OPG in capretti trattati con diclazuril.

opg generalmente associato alla comparsa di forme di emeriosi clinica. Gli interventi rivolti al controllo di questa parassitosi sono minimali e sono effettuati soprattutto negli allevamenti intensivi in cui la numerosità dei capretti favorisce i ritmi di trasmissione. L'approccio è comunque limitato anche in questi casi in quanto avviene sporadicamente e l'unica molecola utilizzata è il diclazuril allo stesso dosaggio per l'ovino (10 mg/kg).

Rispetto al trattamento effettuato a dosaggio doppio (Chartiers e Pors (2000) si può notare un effetto meno persistente (Fig. 3). Infatti, sebbene si verifichi un significativo calo delle oocisti (al 4° giorno), l'incremento delle oocisti avviene più rapidamente già dal 9° giorno post-trattamento. Comunque, anche nel lavoro di Chartiers e Pors, al 14° giorno le oocisti escrete dai trattati eguagliano i valori dei controlli e al 21° giorno addirittura li superano a dimostrazione di come il ritmo d'infezione negli allevamenti caprini sia particolarmente elevato e che l'effetto di un trattamento appare piuttosto effimero.

Recentemente, alcune prove hanno dimostrato un'attività dei tannini condensati sulla sporulazione in vitro delle oocisti delle specie di *Eimeria* del pollo superiore all'80% e sulla escrezione di oocisti da parte di capre adulte. Allo scopo di fornire agli allevatori un ulteriore strumento per il contenimento dei coccidi è stato somministrato con l'alimento un prodotto contenente tannini condensati per verificare la capacità di queste sostanze di ridurre il numero di oocisti escrete dai capretti. Quale fonte di tannini condensati è stato utilizzato un estratto naturale di quebracho, disponibile in commercio (SILVAFEED BY PROQ - SILVATEAM), che ha un contenuto minimo di tannini di tipo condensato del 70%. Il quebracho è stato mescolato al fioccolato di mais utilizzato per lo svezzamento fino a raggiungere la concentrazione di tannini condensati pari al 5% della sostanza secca (corrispondente a 20 g di tannini condensati/die per 400 g di alimento).

I capretti, a partire da T0, hanno ricevuto il cibo contenente la polvere di quebracho una volta al giorno per una settimana. I campioni di feci sono stati raccolti, con prelievo dall'ampolla rettale, a T0, T4, T9, T15. Per la ricerca delle oocisti di *Eimeria*, è stata utilizzata una soluzione di magnesio solfato ed è stato determinato il numero di oocisti/g di feci (opg) utilizzando la tecnica FLOTAC (Cringoli, 2006). Nel corso della prova effettuata su 20 capretti (10 controlli e 10 trattati) il numero di oocisti ha manifestato un significativo decremento ed è risultato essere pari a circa 4 volte meno rispetto al T0 già al 4° giorno di somministrazione. Il valore di opg è aumentato già dal 9° giorno post somministrazione similmente a quanto osservato nei capretti trattati con diclazuril anche se in questo caso le cariche sono molto più elevate (Tabella 11).

I capretti che hanno ricevuto il mangime contenente tannini non hanno manifestato nessun effetto negativo sull'accrescimento ma sia il peso rilevato al T15 sia l'accrescimento medio giornaliero sono risultati significativamente più elevati rispetto ai controlli (Tabella 12).

**Tabella 11** - Escrezione di oocisti in capretti alimentati con una dieta contenente tannini condensati.

	Capretti controllo		Capretti trattati	
	opg		opg	
	medio	ds	medio	ds
T0	35184,0	34171,9	33000,0	30057,9
T4	18320,0	20615,9	7480,0	6929,0
T9	32257,8	33141,0	11468,0	8474,6
T15	56724,4	54317,2	51395,6	36580,7

**Tabella 12** - Peso e accrescimento medio giornaliero (A.M.G.) in capretti alimentati con una dieta contenente tannini condensati.

	Capretti controllo		Capretti trattati	
	Peso		Peso	
	media	d.s.	media	d.s.
T0	17,1	1,6	16,3	1,3
T15	19,1	1,9	18,7	2,0
A.M.G.	128,6	33,9	163,0	68,9

Sicuramente i dati ottenuti dimostrano che i tannini condensati non sono in grado di effettuare una drastica riduzione dell'escrezione di oocisti al pari delle molecole antiprotozoarie; d'altra parte è pur vero che i trattamenti convenzionali non riescono ad eradicare il problema delle coccidiosi. I tannini condensati potrebbero diventare uno strumento complementare da associare ai trattamenti convenzionali per mantenere basso il livello delle cariche di oocisti per tempi maggiori. Inoltre, non è trascurabile l'effetto astringente dei tannini che può contribuire a ridurre l'umidità della lettiera e a contrastare in qualche modo i tempi di sporulazione delle oocisti.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I parassiti gastrointestinali (nematodi e protozoi del genere *Eimeria*) costituiscono una presenza costante negli allevamenti caprini lombardi sebbene dal punto di vista genetico e gestionale gli standard di questi allevamenti possono essere considerati piuttosto elevati grazie anche all'attività del servizio di assistenza messo a disposizione degli allevatori dall'ente regionale. Tuttavia, l'interazione ospite-parassita nella capra presenta delle peculiarità che si ripercuotono innegabilmente sulle strategie attuate per controllarne i parassiti; negli ultimi anni le ricerche volte a chiarire alcuni di questi aspetti sono aumentate ma appare evidente che una buona gestione del parassitismo nei caprini richiede anche la compartecipazione di una forte, competente e motivata assistenza tecnica agli allevatori. Solo in questo modo sarà possibile guidare gli allevatori ad effettuare trattamenti realmente efficaci per la gestione del parassitismo e sfruttare determinate risorse (es. tannini condensati) e capacità naturali della capra in grado di contrastare le infestazioni (Hoste et al 2010) che potrebbero essere utili come mezzi complementari per il controllo dei parassiti.

*Ringraziamenti: si ringrazia La Regione Lombardia per aver in parte supportato finanziariamente le indagini che hanno permesso di acquisire alcuni dati riferiti (Progetto SANCAPR, 2005).*

#### ■ Control of endoparasites in goat farms in Lombardy between conventional and alternative strategies

**Key words:** goat, parasites, gastrointestinal nematodes, *Eimeria*, control.

**La Bibliografia è disponibile presso gli autori.**

# Valutazione dell'impatto sanitario e zootecnico dell'estrosi ovina



A. SCALA, G. GARIPPA

Dipartimento di Biologia Animale, Sez Parassitologia e Malattie Parassitarie,  
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Sassari

**Parole chiave:** miasi, *Oestrus ovis*, ovino.

L'estrosi, miasi nasale o respiratoria, è una parassitosi indotta da larve di *Oestrus ovis*, dittero appartenente alla famiglia Oestridae, che vivono obbligatoriamente nelle cavità nasali e nei seni frontali di ovini, caprini e piccoli ruminanti selvatici. Questa parassitosi viene segnalata ovunque sia praticato l'allevamento ovino, soprattutto in quelle regioni caratterizzate da un clima temperato e caldo, come quelle mediterranee.

A provocare la parassitosi sono le femmine di *O. ovis* che, senza posarsi, "proiettano" le larve in prossimità delle narici degli ovini al pascolo, mentre i maschi vivono generalmente nelle fessure dei muri alla ricerca di spazi che gli consentano un riparo sicuro dai predatori, assicurando così la sopravvivenza della specie.

Questa miasi provoca la produzione di un abbondante scolo nasale dovuto alla rinite, evidente soprattutto in estate, che può causare un'occlusione parziale o totale delle vie aeree superiori responsabili di importanti difficoltà respiratorie. Tale sintomatologia determina problemi al pascolamento e alla ruminazione e si rende responsabile di complicanze polmonari quali polmoniti interstiziali ed ascessi polmonari; inoltre l'estrosi sembrerebbe aumentare anche il rischio di insorgenza di adenocarcinomi della pituitaria (Dorchies et al., 1997). La presenza della parassitosi sembra inoltre interferire anche con le capacità olfattive degli arieti che riescono con maggior difficoltà ad individuare lo stato di estro delle pecore, con conseguente riduzione delle percentuali di fertilità (Watson e Radford, 1960).

Sotto l'aspetto patogenetico la miasi sembrava determinare gravi lesioni in virtù dell'azione delle numerose spine di cui, soprattutto le larve L<sub>1</sub>, sono dotate. In realtà recenti indagini hanno dimostrato che un ruolo determinante, in concomitanza con fenomeni di ipersensibilità (Ipersensibilità di tipo I), viene esercitato dall'attività proteolitica legata ai prodotti di escrezione/secrezione elaborati a livello intestinale dalle larve (ESPs) (Tabouret et al., 2003). L'azione patogena delle larve L<sub>2</sub> ed L<sub>3</sub> si rende evidente particolarmente a carico dei seni, in cui si rileva una disorganizzazione dell'epitelio pluristratificato, con spazi intercellulari allargati, segni evidenti di degenerazione cellulare (presenza di vacuolizzazioni e riduzione della ciliatura apicale), causata sempre dagli ESPs.

L'estrosi, è sicuramente una miasi sottovalutata, soprattutto dagli allevatori, che considerano normali o inevitabili i sintomi da essa causati, quali lo starnuto o lo scolo nasale. Essi infatti vengono spesso attribuiti ad altre cause, prima fra tutte la strongilosi bronco-polmonare. Inoltre paradossalmente, l'elevata diffusione della malattia, come per esempio in Sardegna riscontrata nel biennio 1996-97 in tutti gli allevamenti con il 91% dei soggetti infestati (Scala et al., 2001), la rende, perlomeno apparentemente, meno temibile. Tutto ciò comporta un danno considerevole nell'ambito dell'allevamento ovino, in quanto è ormai ampiamente associato che essa è in grado di determinare notevoli perdite (Caraccappa et al., 2000; Habela et al., 2006), in virtù della diminuzione di peso fino al 22% e delle produzioni della lana sino al 16% (Shcherban, 1973). Anche le produzioni di latte, pur in presenza di una letteratura limitata sull'argomento, sembrerebbe subire importanti influenze: diminuzione delle produzioni sino al 10% (Ilchman et al., 1987), in percentuali

comprese fra il 3,6 e l'8,6% nelle pluripare e dall'8,5 al 12,2% nelle primipare di ovini Lacaune (Dorchies et al., 2003).

La diffusione dell'estrosi a livello nazionale non è stata delineata capillarmente e in alcuni casi mancano dati aggiornati. Tuttavia la parassitosi sembrerebbe essere presente con prevalenze non sottovalutabili in tutte le realtà territoriali italiane dove l'allevamento ovino risulta ben rappresentato: 38% in Puglia (Nardi, 1955); 51% in Emilia Romagna (Pietrobelli e Capelli, 1988); 56% in Sicilia (Caraccappa et al., 2000), 89% nella Marsica (Mantovani e Restani, 1964) e 91% in Sardegna (Scala et al., 2001).

Nonostante ciò la diagnosi di estrosi *in vitam* non viene effettuata di routine, anche per le obiettive difficoltà di un'indagine parassitologica diretta volta ad identificare le larve nelle cavità nasali. La diagnosi clinica tuttavia potrebbe essere agevolata, anche in termini di prognosi, attraverso l'esame del muco nasale che può essere anche soggetto di specifica valutazione con l'attribuzione di un apposito score in base alla consistenza (sierosa o mucosa), all'eventuale contaminazione microbica secondaria (es. muco-purulenta, purulenta) ed alla sua entità, come proposto da Alzieu et al. (1995). In realtà è bene però precisare che la gravità dello scolo nasale non sempre è in relazione diretta con il numero delle larve presenti nelle cavità nasali e nei seni degli animali colpiti, ma appare correlata con la suscettibilità individuale e anche con le complicanze batteriche eventualmente presenti.

Inoltre, anche se attualmente risulta attuata solo sperimentalmente, appare importante lo sviluppo di tecniche immunodiagnostiche, ELISAs diretta o indiretta (Duranton et al., 1995; Marchenko e Marchenko, 1991) ed emoagglutinazione (Bautista-Garfias et al., 1988), utilizzando soprattutto un antigene grezzo estratto da larve L<sub>1</sub> o L<sub>2</sub>. Tuttavia la sensibilità e specificità di queste metodiche non sempre risultano ottimali. Questo aspetto ha evidenziato la necessità per la comunità scientifica di sviluppare un nuovo strumento per la diagnosi specifica di estrosi finalizzata sia alla realizzazione di indagini epidemiologiche che per la messa a punto di vaccini che utilizzino proteine ricombinanti.

Per il controllo di questo parassita sono pertanto necessari l'aggiornamento dei dati epidemiologici e lo sviluppo di tecniche immunodiagnostiche affidabili, in considerazione del fatto che l'uso della maggior parte dei farmaci efficaci nei confronti dell'estrosi è limitato dal divieto d'uso durante la lattazione.

Per questo motivo di centrale importanza è l'individuazione di specifici antigeni immunogenici e l'analisi della risposta immunitaria indotta nei loro confronti.

Tuttavia questo obiettivo è ostacolato dalla complessità dell'antigene grezzo larvale. Queste difficoltà sono state parzialmente superate grazie all'utilizzo di antigeni di secrezione-escrezione (ESP), prodotti principalmente dalle ghiandole salivari e dal tubo digerente delle larve, che si sono dimostrati particolarmente interessanti a scopo diagnostico per la loro specificità e sensibilità. Questi antigeni, parzialmente purificati ed isolati mediante western blotting e cromatografia, hanno consentito di rilevare un complesso antigenico di 28 kDa prodotto dalle ghiandole salivari delle larve del dittero (Tabouret et al., 2001). Tale antigene, successivamente utilizzato in ELISA, ha dato dei risultati significativamente superiori rispetto alle stesse metodiche che utilizzavano l'antigene grezzo (Innocenti

et al., 1995; Angulo-Valadez et al., 2007b). Infatti l'utilizzo degli ESP ha consentito di registrare correlazioni dirette tra l'infestazione e il titolo di IgG (Sanchez-Andrade et al., 2005).

Partendo da queste interessanti premesse, le future linee di ricerca si propongono di utilizzare tecniche proteomiche al fine di individuare e di caratterizzare le proteine maggiormente responsabili della risposta immunitaria dell'ospite.

Attualmente alcune prove basate sulla somministrazione di antigeni di ESP in agnelli hanno rilevato che tale intervento immunizzante non comporta generalmente una diminuzione del tasso di stabilizzazione delle larve nelle cavità nasali rispetto ai soggetti trattati, ma bensì una riduzione significativa del peso e della lunghezza delle larve e una diminuzione del numero di larve  $L_3$  (Angulo-Valadez et al., 2007a; Angulo-Valadez et al., 2008). Quest'ultimo fenomeno, in considerazione di una parziale immunoregolazione naturale dell'infestazione da *O. ovis* negli ovini, potrebbe tuttavia comportare una diminuzione della percentuale di sviluppo delle larve in insetto adulto (Angulo-Valadez et al., 2008), determinando in ogni caso una diminuzione della pressione parassitaria nel territorio.

Appare inoltre interessante l'evidenziazione del fenomeno di interferenza tra la presenza di larve di *O. ovis* e quelle di alcuni nematodi gastro-intestinali come *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. In particolare è stato rilevato che la presenza delle larve di *O. ovis* è in grado di determinare un'influenza negativa sulla fertilità di questi nematodi. Ciò è probabilmente dovuto ad interazioni non specifiche legate al reclutamento degli eosinofili, mentre questa interferenza non si realizza per l'infestazione da *O. ovis*, il cui sviluppo larvale non viene influenzato dalle infestazioni di nematodi gastro-intestinali (Yacob et al., 2008).

Relativamente all'influenza dei fattori climatico-ambientali sul ciclo di *O. ovis*, è ormai dimostrato che condizioni climatico-stagionali favorevoli, in particolare un'elevata temperatura ambientale e un'intensa insolazione, influenzano sia la durata del ciclo di sviluppo dell'insetto che l'attività di deposizione larvale (Zumpt, 1965; Frugere et al., 2000; Jacquet e Dorchies, 2002; Alcaide et al., 2003; Gracia et al. 2006).

Per contro, la ricerca ha quasi del tutto ignorato lo studio dei meccanismi funzionali mediante i quali l'insetto adulto riconosce il suo partner sessuale - e perciò può accoppiarsi e riprodursi. Analogamente, pressoché sconosciuti sono i fattori biologici attraverso i quali la femmina adulta gravida identifica l'ospite, ne è attratta e lo parassitizza. Una comprensione di tali meccanismi funzionali e dei fattori biologici ad essi collegati sarebbe di importanza fondamentale sia per programmare interventi di "mating disruption", che per attuare strategie di controllo con l'impiego di sistemi di cattura dell'insetto adulto, con conseguente diminuzione dell'impatto sull'ospite.

Studi effettuati sull'Oestridae, *Cephenemyia trompe*, avevano dimostrato che questo insetto era dotato di sensibilità olfattoria. Dato che sia l'anidride carbonica che l'odore dell'animale ospite risultavano potenti attrattori per le femmine adulte gravide, era stato prospettato l'impiego di tali componenti chimiche volatili per predisporre trappole per la loro cattura (Anderson e Olkowski, 1968; Anderson, 1989). Indagini sperimentali "in campo" avevano successivamente dimostrato che diverse sostanze chimiche inducono attrazione in specie di insetti ematofagi e in specie di Oestridae diverse rispetto a *O. ovis*, risultando perciò di interesse per predisporre sistemi di cattura basati sull'impiego di trappole chimiche (Anderson and Nilssen, 1996; Nilssen, 1998; Anderson et al., 2001).

Tuttavia, i risultati di uno studio comportamentale su adulti di *O. ovis* avevano portato a ipotizzare che l'orientamento delle femmine gravide verso l'ospite fosse quasi esclusivamente guidato da informazioni sensoriali visive (Cepeda-Palacios e Scholl, 2000), mentre la presenza di sostanze volatili emanate dall'ospite (potenziali segnali olfattori) non avrebbe giocato alcun ruolo nelle scelte comportamentali operate dall'insetto. Tuttavia, alla luce delle attuali conoscenze in materia di chemiorecezione olfattoria sensoriale e di neurobiologia del comportamento negli insetti, i risultati sulla valutazione funzionale olfattoria effettuata da Cepeda-Palacios e

Scholl (2000) appaiono largamente insufficienti e non probativi, in considerazione dell'inadeguato approccio tecnico-procedurale adottato. In particolare, le analisi comportamentali erano state effettuate utilizzando un numero di insetti troppo esiguo per questo tipo di indagine. Peraltro, l'approccio sperimentale non aveva consentito agli Autori di valutare né l'età né le condizioni vitali degli insetti, fattori dei quali è ben nota l'importanza nel conferire un elevato grado di variabilità alle scelte comportamentali di questi organismi animali (Dethier, 1974).

A tali considerazioni pertanto consegue che a tutt'oggi non è stato ancora definito se l'informazione sensoriale olfattoria, integrandosi verosimilmente con quella visiva, possa giocare un ruolo nel determinare l'attrazione che l'ospite esercita nei confronti di femmine gravide di *O. ovis*. Un miglioramento delle conoscenze in questa direzione potrebbe consentire la messa a punto di strategie di controllo del parassita attraverso l'utilizzo di trappole che emettono sostanze "attiranti" l'insetto adulto, con prospettiva di limitare i danni per l'ospite.

Al di là di queste prospettive di controllo al momento, anche nel nostro paese può essere efficacemente applicato uno schema di controllo simile a quello proposto dai ricercatori sudafricani. Tale protocollo prevede il trattamento delle greggi due volte l'anno, una prima volta all'inizio dell'estate per eliminare le larve di nuova acquisizione ed una seconda a metà inverno per eliminare le larve sopravvissute al freddo. In Italia potrebbe essere sufficiente un unico trattamento alla fine della stagione di attività degli insetti adulti (autunno). Nei casi di forte pressione parassitaria potrebbe essere utile un ulteriore trattamento a fine lattazione (giugno-luglio), utilizzando ad esempio il closantel, molecola dotata di effetto residuale di circa 4-6 settimane, che garantisce una buona copertura degli ovini dall'azione di nuove larve estive. Tale trattamento tuttavia può risultare insufficiente in presenza di contemporanee infestazioni sostenute da altri parassiti (es. nematodi gastro-intestinali e/o bronco-polmonari), nel cui caso sarebbe invece opportuno l'intervento farmacologico con lattoni macrociclici. Altre molecole dotate di ottima efficacia nei confronti delle larve di *O. ovis* sono il rafoxanide e il nitroxylinil, il cui limite tuttavia rimane quello del divieto di utilizzo in lattazione.

Infine vale la pena di suggerire agli addetti ai lavori, in virtù dell'alta efficacia dei farmaci disponibili in commercio per l'estrosi, di "pensare", specie in territori come la Sardegna e/o la Sicilia, regioni protette dalla propria insularità, l'attuazione di piani di controllo preferibilmente sotto l'egida degli Enti Sanitari regionali che, in analogia a quanto attuato in altri distretti per l'hypodermosi bovina, nel giro di qualche anno potrebbero garantire risultati importanti. Non riteniamo particolarmente efficace nel lungo periodo invece l'utilizzo di repellenti nei confronti dell'insetto adulto.

Un ulteriore aspetto utile per il controllo di questa miasi potrebbe derivare dai risultati di una ricerca in atto presso la nostra struttura che ha lo scopo di ricercare nell'ovino delle zone del genoma (QTL) che influenzano i meccanismi di resistenza all'estrosi. Tale ricerca si basa preliminarmente sulla misurazione di due caratteri fenotipici legati all'infestazione, quali i livelli di Densità Ottica ottenuti in ELISA per le IgG e IgM e la misurazione dello "score" dello scolo nasale di una popolazione ovina sperimentale presente nel sud della Sardegna. Al momento attuale sono in corso di analisi per la definizione dei fenotipi da utilizzare per l'identificazione dei QTL.

Parlando di estrosi da *O. ovis* appare doveroso ricordare anche l'interesse zoonotico di questa parassitosi: nell'uomo vengono infatti segnalati con una certa frequenza, soprattutto in Medio Oriente e nel bacino del Mediterraneo, casi di oftalmomiasi dovute alle larve di primo stadio che *O. ovis* catapulta per "errore" nella congiuntiva, cavità buccale, narici e condotto uditivo esterno, soprattutto di pastori intenti alle operazioni quotidiane eseguite sul gregge (mungitura, spostamento, tosatura, ecc.). Questi casi di oftalmomiasi risultano particolarmente diffusi anche sul territorio nazionale, rendendo così l'estrosi una zoonosi da non sottovalutare (Scala et al., 1999;



Pampiglione et al., 1997; Giannetto et al., 2001). A riguardo appare interessante notare come già Pampiglione nel 1958, in un'apposita rassegna, segnalava in Italia 414 casi di miasi congiuntivale da larve di *O. ovis* nell'uomo. Scala et al. nel 1999 rilevavano che il 38,5% degli allevatori sardi erano stati "colpiti" dalle larve del dittero una o più volte durante l'arco dell'anno, soprattutto nel periodo da aprile a settembre a livello congiuntivale (56,4%), faringeo (27,5%) e nasale (16,1%).

Appare quindi evidente come un razionale controllo di questa miasi, oltre a determinare un miglioramento dello stato di salute degli animali con positive ripercussioni sulle produzioni e sul benessere animale, possa nel contempo diminuire la pressione parassitaria in un determinato territorio, con risvolti positivi anche per ciò che concerne l'aspetto zoonotico.

*Parte della presente relazione è stata realizzata grazie ad un finanziamento nell'ambito del progetto "APQ per la ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica, progetto P5a - Attivazione del Centro di biodiversità animale per la valorizzazione del patrimonio animale con riferimento alla produzione e alla ricerca al servizio dell'allevamento" della Regione Sardegna.*

## ■ Health and livestock impact assessment of ovine oestrosis

**Key words:** Miasis, *Oestrus ovis*, sheep.

## Bibliografia

- Alcaide M., Reina D., Sánchez J., Frontera E., Navarrete I. (2003) - Seasonal variations in the larval burden distribution of *Oestrus ovis* in sheep in the southwest of Spain. *Vet. Parasitol.* 118: 235-241.
- Alzieu J.P., Dorchies P., Donat F., Chiarisoli O. (1995) - Nuovi dati epidemiologici dell'estrosi ovina, prevenzione tramite il closantel. *Summa* 19(6): 19-26.
- Anderson J.R. (1989) - Use of deer models to study larviposition by wild nasopharyngeal bot flies (Diptera: Oestridae). *J. Med. Entomol.* 26: 234-236.
- Anderson J.R., Nilssen, A.C. (1996) - Trapping oestrid parasites of reindeer: The response of *Cephenemyia trompe* and *Hypoderma tarandi* to baited traps. *Med. Vet. Entomol.*, 10 (4): 337-346.
- Anderson J.R. and Olkowski W. (1968) - Carbon dioxide as an attractant for host-seeking *Cephenemyia* females (Diptera: Oestridae). *Nature*, 220: 190-191.
- Anderson J.R., Nilssen, A.C., Hemmingsen, W. (2001) - Use of host-mimicking trap catches to determine which parasitic flies attack reindeer, Rangifer tarandus, under different climatic conditions. *Can. J. Zool.*, 115 (2): 274-286.
- Angulo-Valadez C.E., Cepeda-Palacios R., Jacquet P., Dorchies P., Prévot F., Ascencio-Valle F., Ramirez-Orduna J.M., (2007a) - Effects of immunization of Pelibuey lambs with *Oestrus ovis* digestive tract protein extracts on larval establishment and development. *Vet. Parasitol.* 143: 140-146.
- Angulo-Valadez C.E., Cepeda-Palacios R., Ascencio-Valle F., Jacquet P., Dorchies P., Romero M.J., Khelifa R.M. (2007b) - Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. *Vet. Parasitol.* 149: 117-125.
- Angulo-Valadez C.E., Scala A., Grisez C., Prevot F., Bergeaud J.P., Carta A., Cepeda-Palacios R., Ascencio F., Terefe G., Dorchies P., Jacquet P. (2008) - Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) infected sheep: Associations with intensity of infection and larval development. *Vet. Parasitol.* 155(3-4): 257-263.
- Bautista-Garfias C.R., Angulo-Contreras, R.M. and Garay-Garzon, E. (1988) - Serological diagnosis of *Oestrus ovis* in naturally infested sheep. *Med. Vet. Entomol.*, 2: 331-335.
- Cepeda-Palacios R. and Scholl P. J. (2000) - Factors affecting the larvipositional activity of *Oestrus ovis* gravid females (Diptera: Oestridae). *Vet. Parasitol.*, 91(1-2): 93-105.
- Caracappa S., Riili S., Zanghi P., Di Marco V., Dorchies P. (2000) - Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. *Vet. Parasitol.* 92(3,1): 233-237.
- Dethier V.G. (1974) - Sensory input and the inconstant fly. In: Browne, L.B. (Ed.), *Experimental Analysis of Insect Behaviour*. Springer, Berlin, pp. 21-31. *Franc. Parasitol.* 13 (4): 311-313.
- Dorchies P. and Alzieu J.P. (1997) - L'Oestrose ovine: review. *Rev. Med. Vet.* 148: 565-574.
- Dorchies P., Wahetra S., Lepetitcolin E., Prevot F., Grisez C., Bergeaud J.P., Hoste H. (2003) - The relationship between nasal myiasis and the prevalence of enzootic nasal tumours and the effects of treatment of *Oestrus ovis* and milk production in dairy ewes of Roquefort cheese area. *Vet. Parasitol.* 113 (2): 169-174.
- Duranton C., Bergeaud, J.P. and Dorchies, P. (1995) - Le dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): méthode de dépistage rapide de l'oestrose ovine. *Rev. Med. Vet.*, 146: 283-286.
- Frugere S., Leon A.C., Prevot F., Palacios R.C., Tabouret G., Bergeaud J. P., Duranton C., Dorchies P., Jacquet P. (2000) - Immunisation of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. *Vet. Res.* 31 (5): 527-535.
- Gracia M.J., Lucientes J., Peribáñez M.A., Calvete C., Ferrer L.M., Castillo J.A. (2006) - Kinetics of *Oestrus ovis* infection and activity of adult flies. *Parasite*. 13(4): 311-3.
- Giannetto S., Poglayen G., Ferlazzo M., Virga A., Sanna-Coccone G., Scala A. (2001) - Miasi causata da *Oestrus ovis* (Diptera, OESTRIDAE) tra i pastori siciliani. *Publicaciones IX Congreso Internacional Federation Mediterranea De Sanidad Y Produccion De Ruminantes* 9: 456-459.
- Habela M., Moreno A., Gragera-Slikker A., Gomez J.M., Montes G., Rodriguez P., Alvinerie M. (2006) - Efficacy of eprinomectin pour-on in naturally *Oestrus ovis* infested merino sheep in Extremadura, South-West Spain. *Parasitol. Res.* 99: 275-280.
- Iichmann G., Spliteser H., Betke P. (1987) - Problems of large scale control of oestrose in sheep. *Med. Vet. Dipterosol.* 233-234.
- Innocenti L., Masetti M., Macchioni G., Giorgi F. (1995) - Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. *Vet. Parasitol.* 60: 273-282.
- Jacquet P., Dorchies P. (2002) - Towards a lower prevalence of *Oestrus ovis* infections in sheep in a temperate climate (south west France). *Vet. Res.* 33: 449-453.
- Mantovani A., Restani R., Napolione B. (1964) - Prime ricerche sulle parassitosi delle pecore della Marsica. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* 8: 441-442. 1964
- Marchenko V.A. and Marchenko, V.P. (1991) - Kinetics of specific serum antibodies in sheep infested with *Oestrus ovis* larvae. *Parasitologia*, 25: 297-304.
- Nardi E. (1955) - Ricerche parassitologiche sugli ovini pugliesi. *Atti Soc. It. Sci. Vet.* 9: 603-606.
- Nilssen A.C. (1998) - Effect of 1-octen-3-ol in field trapping *Aedes* spp. (Dipt., Culicidae) and *Hybomitra* spp. (Dipt., Tabanidae) in subarctic Norway. *J. Appl. Entomol.*, 122 (8): 465-468.
- Pampiglione S., Giannetto S., Virga A. (1997) - Persistence of human myiasis by *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) among shepherds of the Etnean area (Sicily) for over 150 years. *Parassitologia* 39: 415-418.
- Pietrobelli M., Capelli G. (1988) - Observations on the development of larvae of *Oestrus ovis* in sheep. *Parassitologia*, 30 (Suppl.): 140-141.
- Sánchez- Andrade R., Suárez J.L., Pedreira J., Díaz P., Arias M., Paz-Silva A., Panadero R., Díez-Baños P., Morrondo P., Scala A. (2005) - Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunol. Invest.* 1: 89-97.
- Scala A., Barbieri A., Solinas G., Bitti P.L., Pintori A., Uras P., Pilia A. (1999) - L'estrosi da *Oestrus ovis* in Sardegna: indagine conoscitiva sulla presenza della miasi negli allevamenti ovini e nell'uomo. *Proceedings 7<sup>o</sup> Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants* 7: 241-245.
- Scala A., Solinas G., Citterio C.V., Kramer L.H., Genchi C. (2001) - Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol.* 102: 133-141.
- Shcherban N.F. (1973). Prevention of *Oestrus ovis* infestation. *Veterinary*, 2: 71-72.
- Tabouret G., Bret-Bennis L., Dorchies P., Jacquet P. (2003) - Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* 114: 305-314.
- Watson, R. H., Radford, H. M. (1960) - The influence of rams on onset of oestrosis in Merino ewes in the spring. *Aust. J. Agric. Res.* 11: 65.
- Yacob H.T., Basazinew B.K., Bas A.K. (2008) - Experimental concurrent infection of Afar breed goats with *Oestrus ovis* (L1) and *Haemonchus contortus* (L3): Interaction between parasite populations, changes in parasitological and basic haematological parameters. *Experim. Parasitol.*, 120(2): 180-184.
- Zumpt, F. (1965) - Myiasis in Man and Animals in the Old World. *Butterworths*, London, 225.

# Malattie trasmesse da zecche in ovini e caprini: aspetti clinici e diagnostici



A. TORINA, S. CARACAPPA

Centro Nazionale di Referenza per Anaplasma, Babesia, Rickettsia e Theileria (CRABaRT)  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** Ixodidae, Babesia, Theileria, Anaplasma.

**INTRODUZIONE** - Le malattie trasmesse da zecche provocano nei piccoli ruminanti seri danni nelle regioni tropicali e subtropicali. Negli ovini e, ancor di più, nei caprini sono patologie poco studiate anche se l'allevamento di queste specie in alcune regioni rappresenta la principale voce del patrimonio zootecnico. Tramite le zecche i piccoli ruminanti possono essere infettati da agenti patogeni virali (Virus dell'encefalite da zecche, Thogoto virus, ecc), batterici (*Rickettsiales*, *Borrelia*, *Francisella*) e protozoari (*Babesia* e *Theileria*), alcuni di questi sono anche agenti di zoonosi (Crimea Congo haemorrhagic fever virus, *C. burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, ecc.). In Italia le patologie dovute ai generi *Anaplasma*, *Babesia*, e *Theileria* sono diffuse.

L'anaplasmosi ovina è una malattia generalmente subclinica, l'agente eziologico è, nella maggior parte dei casi, *Anaplasma ovis*. Non sono stati registrati episodi di cross-infezione e cross-immunità fra *A. marginale* ed *A. ovis* ma, sono state registrate infezioni subcliniche da *A. marginale* sia in pecore che in capre. Negli ovini la malattia decorre generalmente in forma subclinica ma occasionalmente può assumere caratteri di severità specialmente in concomitanza di poliparassitismo. L'anaplasmosi nelle capre causata da *A. ovis* è stata descritta come una patologia subclinica, non patogena, con febbre moderata e di scarso apparente impatto, tuttavia in certe situazioni può assumere caratteri clinici di particolare gravità. Al genere *Anaplasma* appartiene anche *A. phagocytophilum* agente di infezione nei ruminanti domestici. Esso è responsabile della febbre da zecca (tick-borne-fever TBF), nelle pecore, e della febbre da pascolo nei bovini. La batteriemia e la neutropenia possono permanere per circa 1-2 settimane. Spesso sono assenti altri segni clinici o sono modesti, raramente la tick-borne-fever (TBF) risulta fatale. La Babesiosi è una malattia emoparassitaria degli animali domestici e selvatici. La *Babesia* causa febbre, anemia, emoglobinuria ed ittero nei piccoli ruminanti. *Babesia ovis* e *Babesia motasi* sono responsabili di malattia nelle pecore e nelle capre, gli effetti della *B. ovis* sono generalmente meno gravi della *B. motasi*. Le zecche del genere *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* ed *Ixoides* sono responsabili della trasmissione di questi parassiti ed, in base al vettore implicato, il parassita può essere trasmesso per via trans-ovarica e trans-stadiale. La Theileriosi ovina e caprina è causata da *Theileria lestoquardi* (prima denominata *T. hirci*), nelle pecore suscettibili, la malattia può essere altamente patogena. *T. lestoquardi* può essere trasmessa da *Hyalomma* spp, ma *Rhipicephalus bursa*, vettore di *B. ovis*, è stata anche incriminata come vettore di *T. lestoquardi*.

**MATERIALI E METODI** - Presso il CRABaRT vengono eseguite indagini biomolecolari e sierologiche a scopo diagnostico e di ricerca. Per le indagini biomolecolari sono state eseguite PCR per la ricerca di *Anaplasma* spp (S. Stuen et al, 2003), *A. marginale/A. ovis* e *Anaplasma phagocytophilum* (de la Fuente J. et al, 2005). La ricerca biomolecolare dei protozoi è stata effettuata tramite la tecnica della Reverse Line Blot Hybridization che individua protozoi appartenenti a *T. ovis*, *T. annulata*, *T. lestoquardi*, *Theileria* sp1 (China), *Theileria* sp2 (China), *B. crassa*, *B. ovis*, *B. motasi*, *B. major*, *Babesia* sp1 (Turchey), *Babesia* sp2 (Lintan) (Gubbels et al. 1999; Schnittger et al, 2004). Per gli esami sierologici viene adottato un test ELISA

competitivo per la ricerca di anticorpi anti- *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, e *A. ovis* (cELISA, VMRD, Pullman, WA 99163) e per *A. phagocytophilum* un test di immunofluorescenza indiretta (Fuller Laboratories, Fullerton, CA, USA). Il kit utilizzato è stato adattato agli ovini e caprini utilizzando coniugati FITC anti-sheep e anti-goat (Sigma, St. Louis, MO, USA). Sui risultati ottenuti dai campioni ovini e caprini pervenuti dal 2004 al 2009 è stata calcolata la prevalenza di infezione. Il 92% dei campioni provenivano dalle regioni meridionali.

**RISULTATI** - Le prevalenze sierologiche riscontrate sono per gli ovini del 82,9% per *A. ovis* e 11,9% per *A. phagocytophilum*, per i caprini 74,9% per *A. ovis* e 15,2% per *A. phagocytophilum*. Per quanto riguarda le prevalenze biomolecolari riscontrate i valori sono per gli ovini del 47,3% per *A. ovis* e 5,4% per *A. phagocytophilum*, mentre per i caprini sono del 31,7% per *A. ovis* e 2,5% per *A. phagocytophilum*. Le prevalenze ottenute dalla RLB sono le seguenti: 4,1% per *T. annulata*, 7,1% per *T. lestoquardi*, 17,7% per *T. ovis*, 32,0% per *Theileria* sp1 china, 23,4% per *Theileria* sp2 china, 1,0 per *B. ovis*, 12,2% per *Babesia* sp1, 12,0% per *Babesia* sp2.

**CONSIDERAZIONI** - Da quanto sopra esposto le malattie trasmesse da zecche sono molto diffuse negli ovini e nei caprini, esse spesso passano inosservate per l'andamento subclinico delle patologie e per la resistenza naturale dagli animali delle razze autoctone dei territori endemici per queste patologie. L'anaplasmosi causata da *A. ovis* è la patologia maggiormente diffusa e che causa manifestazioni acute in allevamento (Torina et al. 2010), *A. phagocytophilum* è anche presente e la maggiore prevalenza riscontrata nei caprini potrebbe essere giustificata dal fatto che questi ultimi vengono allevati in aree marginali dove è più facile il contatto con la zecca *Ixodes ricinus* vettore del patogeno. I protozoi sono presenti con prevalenza minore, i patogeni appartenenti al genere *Theileria* sono maggiormente presenti rispetto a quelli del genere *Babesia*. La diagnosi spesso viene effettuata in base alle manifestazioni cliniche in occasione degli sporadici episodi di infezione con sintomatologia. Raramente viene richiesta la diagnosi di laboratorio e si procede alla somministrazione della cura senza il supporto laboratoristico. Se questo tipo di approccio poteva essere valido in passato, oggi, alla luce dei fenomeni di resistenza ai farmaci degli agenti patogeni, alla movimentazione animale ed all'introduzione di razze non autoctone migriorative, implementare lo studio di tali patologie non solo ha un importante significato per la ricerca scientifica, epidemiologica e la prevenzione, ma darebbe un concreto aiuto all'allevatore nell'arginare tali patologie spesso subdole. Infatti, viene trascurato comunque il fatto che, al di là dei casi acuti con evidenti perdite per l'allevatore, questi patogeni permangono nell'ospite allo stato latente e, oltre a rappresentare un costante pericolo di acutizzazione della malattia, dovuta a cambiamenti fisiologici o fattori di stress dell'animale potrebbero essere causa di continua perdita di rendimento in termini produttivi.

■ Tick borne diseases in sheep and goats: clinical and diagnostic aspects

**Key words:** Ixodidae, Babesia, Theileria, Anaplasma.

### Bibliografia

- Stuen S., Nevland S. and Moum T. 2003. Fatal cases of tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum* Ann. N.Y. Acad. Sci. 990: 443-434.
- de la Fuente J., Torina A., Caracappa S., Tumino G., Furlá R., Almazán C., Kocan K.M. 2005a. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet. Parasitol. 133, 357-362.
- Gubbes J.M., de Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E. and Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. Journal of Clinical Microbiology, June, 1782-1789.
- Schnittger L., Yin H., Qi B., Gubbels M.J., Beyer D., Niemann S., Jongejan F., Ahmed J.S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res, 92:189-96.
- Torina, A., Galindo, R.C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., Fiasconaro, M., Scimeca, S., Alongi, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., de la Fuente, J. 2010. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. Tropical Animal Health and Production, in press.

**Prospettive  
di sviluppo  
dell'allevamento  
degli animali  
da fibra**



## La filiera tessile per lo sviluppo dei territori



**M. ANTONINI**

Presidente Consorzio Arianne

Il consorzio *Arianne* è un consorzio internazionale pubblico privato composto da 34 soci, 3 extraeuropei, 2 Enti pubblici, 7 associazioni di categoria e 22 Imprese di cui 11 agricole. *Arianne* è nato come uno strumento per lo studio delle fibre naturali per poi divenire, su indicazione dei soci, anche uno strumento per promuovere un nuovo sistema di concepire la filiera del tessile naturale.

Arianne ha come principale missione la messa a punto di sistemi per il sostegno e la valorizzazione delle imprese agricole produttrici di fibre tessili, animali e vegetali, e colori naturali. Per giungere a questo obiettivo *Arianne* promuove iniziative che possano permettere il reinvestimento di parte del valore aggiunto prodotto dalla filiera, direttamente nell'impresa agricola. A questo proposito il consorzio agisce per l'accorciamento della Filiera in modo da avvicinare il produttore al mercato e chiede, quando possibile, alle PMI coinvolte che si possano mettere a servizio delle imprese agricole desiderose di entrare nella filiera tessile. Tale sistema viene proposto sia per i territori europei che extra europei agendo su tre livelli:

- promozione di progetti di ricerca e sviluppo (2 progetti in corso);
- promozione e gestione di attività di cooperazione territoriale (3 progetti in corso ed 1 in attesa di valutazione);
- iniziative di supporto all'impresa agricola per la commercializzazione dei prodotti (3 iniziative in corso).

Il consorzio offre ai soci attività di servizio che vanno dalla formazione, alla trasformazione dei prodotti fino alla messa a disposizione di un Marchio che garantisca l'origine della fibra ma fondamentalmente che assicuri che parte del valore aggiunto prodotto ritorni a disposizione dell'impresa agricola attraverso la promozione di progetti di co-sviluppo nell'ottica della Responsabilità sociale di impresa a salvaguardia dei territori coinvolti. La creazione di campionari per l'abbigliamento e l'abitare, autogestiti dalla rete delle imprese del consorzio (agricole e tessili) è l'ultima iniziativa consortile promossa a supporto di un nuovo modo di pensare la filiera tessile.

Per giungere agli obiettivi prefissati, il consorzio attualmente sta affrontando due tipi di problematiche: start up delle iniziative legate ai campionari e l'individuazione dei mercati recettivi alla nuova proposta.

Per il primo punto le problematiche da affrontare sono essenzialmente di natura finanziaria e organizzativa mentre per il secondo punto i temi critici sono la individuazione del mercato sensibile da coniugare alla dimensione relativamente limitata delle produzioni, considerando il forte legame ai territori di produzione che offrono ovviamente quantità limitate e a volte qualità variabili nelle differenti stagioni di produzione.

# La fibra animale: una risorsa naturale ed il risultato dello studio nella complessità biologica per una applicazione pratica



**H. GALBRAITH**

School of Biological Sciences, University of Aberdeen, 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY, UK

**Parole chiave:** fibra animale, follicolo pilifero, regolazione della crescita del follicolo, variazione genetica.

Il mantello (vello) ed i suoi prodotti in fibra sono elaborati naturalmente da una serie di specie animali domestiche. In particolare alcune razze ovine sono note per la lana sottile (Merino) e tra le caprine, la razza Angora e Cashmere. Proprietà importanti delle fibre sono le caratteristiche fisiche e la quantità prodotta, che possono essere ottimizzate attraverso la conoscenza della biologia fondamentale della produzione della fibra. Un tale approccio riconosce la complessità dello sviluppo pre e post-natale e la regolazione da parte di un sistema esterno ed interno di tipo fisiologico e molecolare. La maggioranza delle ricerche finora condotte si sono focalizzate sulle singole specie tra cui i piccoli ruminanti, i camelidi sudamericani, l'uomo ed i topi geneticamente modificati.

È noto che le fibre sono sintetizzate, unicamente nei mammiferi, nei follicoli piliferi presenti nella pelle. I follicoli, classificati a volte come mini-organi, si riscontrano in due principali forme anatomiche, "primarie" e "secondarie", ed in una serie di sottotipi. Le fibre più sottili e commercialmente più importanti sono principalmente prodotte dai follicoli piliferi secondari. Per questo in fase di selezione vengono favoriti gli animali con un rapporto a vantaggio dei follicoli secondari rispetto ai primari. Considerando la biologia della produzione delle fibre animali, è utile considerare ambedue i tipi di fibre e follicoli piliferi. Le caratteristiche importanti per le fibre sono il numero, la lunghezza, il diametro (finezza), il midollo, la piegatura, la struttura della cuticola, la lucentezza, la pigmentazione e la resistenza alla tensione. Queste caratteristiche sono regolate dal numero, la struttura, le cellule e le attività molecolari dei follicoli piliferi che li producono.

Studi scientifici dimostrano che i follicoli sviluppano nell'embrione dalla interazione tra il mesoderma (che forma la papilla dermica) ed il sovrastante ectoderma (che forma la fibra). Queste strutture continuano ad interagire nel follicolo post-natale nella produzione della fibra e delle sue componenti cellulari che sviluppano dai cheratinociti, a seconda della posizione nella matrice del bulbo pilifero. La sintesi della pigmentazione nella fibra dipende dalla presenza di melanociti basali nella matrice e dalla loro risposta ad attivatori o inibitori della sintesi della eumelanina o della feumelanina. La struttura anatomica e l'attività post-natale dei follicoli varia in funzione della specie e della localizzazione nel corpo animale. Tutti i follicoli mostrano cicli di crescita attiva delle fibre (anagenesi) seguite da fasi di regressione del follicolo (telogenesi). La rigenerazione produce un nuovo bulbo nella papilla dermica pre-esistente e la espulsione della fibra prodotta in precedenza. La durata della anagenesi è di centrale importanza nel determinare i risultati e la va-

riabilità, per esempio, in un periodo di due anni o più nella produzione della lana Merino rispetto ai 6 mesi, o meno, per il Cashmere nelle capre.

Una lunga anagenesi è stata associata al mantenimento dell'attività dei follicoli secondari nei genotipi con un'alta prevalenza dei follicoli secondari sui primari, come negli animali "single-coated". Il preciso meccanismo responsabile di ciò, in un complesso di ritmi biologici, non è stato stabilito.

I risultati degli studi sulla composizione della fibra hanno dimostrato la presenza di cellule contenenti cheratina, proteine associate alla cheratina e molecole di adesione. Queste sono derivate dalla espressione di una serie di geni, di cui si conosce progressivamente un numero sempre maggiore. In pratica, queste cellule e le molecole che le costituiscono contribuiscono alla presenza di caratteristiche fisiche desiderate. È anche nota l'importanza del supporto nutritivo, soprattutto in termini di amminoacidi contenenti zolfo durante la produzione delle fibre da parte degli animali, per la competizione nei confronti di substrati diversi dalle fibre.

Diversi meccanismi fisiologici, cellulari e molecolari di controllo entrano nel meccanismo di regolazione dello sviluppo del follicolo, nella ciclicità, nella risposta al fotoperiodo ed allo stato fisiologico (ad esempio lo stadio di sviluppo, il sesso, la gravidanza, la lattazione). E c'è un particolare interesse nello studio del "timing" della raccolta del vello nei giovani animali che producono fibre più sottili.

Ormoni importanti, fattori di crescita ed inibitori come segnalatori chimici e recettori sono stati identificati. Questi mediano il meccanismo associato alla presenza o meno di follicoli nella cute, sviluppo e rapporto tra i follicoli primari e secondari, la presenza di melanociti, la sintesi di strutture fibrose identificabili e l'espressione di proteine strutturali, catalitiche e di segnale. Possono inoltre regolare il tasso di divisione dei cheratinociti e quindi il tasso di crescita delle fibre.

La conoscenza di questi meccanismi e molecole di segnale contribuiscono alla comprensione della base genetica delle variazioni fenotipiche relative ai follicoli ed alle fibre, incluse quelli responsabili di differenze tra specie diverse e tra soggetti della stessa specie. Contribuisce inoltre alla selezione genetica, in particolare se riferita a particolari caratteristiche.

In conclusione, la ricerca ha dimostrato che la crescita delle fibre animali è il risultato di un complesso sistema biologico di formazione e attività del follicolo, apporto di nutrienti e loro utilizzo e risposta a segnali chimici interni ed esterni.

La conoscenza ottenuta da questa ricerca trova applicazione nella pratica di allevamento degli animali e nella gestione e nel successivo trattamento del prodotto delle fibre animali.

## Industria tessile e materie prime



### N. THOMPSON

Presidente del Consorzio "Biella The Wool Company"

Il Consorzio è formato da un gruppo di esperti (specialisti di settore e di processo) e di piccole e medie imprese laniere del distretto tessile biellese in grado di coprire tutte le fasi del processo di produzione per l'allevatore che vuole aggiungere valore alla propria lana: dalla selezione della lana sucida alla confezione del capo finito. Collaborando con associazioni nazionali ed estere promuoviamo nel mondo la qualità e la diversità delle lane autoctone e la capacità e creatività delle imprese tessili biellesi.

Data l'importanza che oggi viene riconosciuta alla qualità dei prodotti naturali, ci rivolgiamo direttamente agli allevatori e alle loro associazioni che vogliono creare e commercializzare dei prodotti originali realizzati con la propria lana autoctona e certificarne l'origine e la qualità.

L'origine e la qualità del prodotto, il rispetto dell'ambiente e dei diritti umani è garantita dal marchio "BIELLA THE WOOL COMPANY". Offriamo al cliente anche solo una fase di lavorazione, ma è importante per l'allevatore sapere che qualsiasi lavorazione è stata fatta all'interno del sistema Biella The Wool Company.

Questo nostro cuore, La filiera, ci permette di seguire altre strade dal interno del Consorzio, in collaborazione con Enti, Associazioni e Privati, in Italia, in Europa, e nel mondo.

**IL CENTRO RACCOLTA/CONTROLLO QUALITÀ/VENDITA LANE ITALIANE** - Una gestione completa della lana grezza dalla pecora al mercato, creando canali di raccolta, di trasporto e di vendita, in pieno rispetto delle leggi in vigore per quanto riguarda l'ambiente e il benessere del animale con lo scopo principale di incrementare il suo reddito, grazie anche ad uno scambio di informazioni costante e indipendente. Un'organizzazione dove l'allevatore partecipa anche nelle decisioni prese per raggiungere tale scopo.

**PROMOZIONE DELLA LANA** - Da almeno 2 generazioni non c'è

promozione di lana, in nessuna parte del mondo. Comunque il futuro richiederà più fibre naturali e la pecora potrà avere un ruolo importantissimo. Dobbiamo comunicare con i consumatori spiegando quanto segue:

#### La lana è naturale

- Rinnovabile
- Sostenibile
- Biodegradabile
- A bassa emissione di CO<sub>2</sub>
- Efficiente dal punto di vista energetico

#### La lana è sicura

- È ignifuga
- Protegge dai raggi UV
- Riduce l'elettricità statica
- Alta resistenza alle temperature

#### La lana è salutare

- Traspirante
- Controlla l'umidità
- Bassa allergicità
- Filtraggio chimici tossici
- Fonoassorbente

**WOOLS OF EUROPE** - Una Esposizione itinerante, lanciata a Rambouillet ai primi di maggio 2010, che dimostra la biodiversità di quasi 100 razze di pecore europee da 27 nazioni diverse in 300 metri quadrati. Si può toccare la lana appena tosata, leggere la storia della razza, e vedere un prodotto finito dal vello stesso accompagnato da qualche notizia sulla sua produzione.

**Vaccini e Vaccinazioni:  
recenti acquisizioni  
nel settore ovino  
e caprino**



## Tipizzazione molecolare di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da latte ovino



A. DE GIUSEPPE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

L'agente causale principale delle mastiti cliniche e subcliniche nei piccoli ruminanti è rappresentato da *Staphylococcus aureus*. L'importanza di queste mastiti è dovuta prevalentemente al loro impatto economico (morbilità, mortalità, costo dei trattamenti, modificazioni della produzione del latte, ecc...) ed ai problemi di sanità pubblica (possibile presenza nel latte di batteri patogeni per l'uomo). Infatti, i dati epidemiologici attribuiscono al consumo di latte e derivati il 4,8% dei casi di tossinfezione alimentare e per tale motivo le mastiti costituiscono un problema di regolamentazione.

La profilassi indiretta delle mastiti da stafilococco si basa sull'impiego di autovaccini la cui efficacia viene rilevata essenzialmente in base alla risoluzione dei quadri clinici. A seguito della riscontrata molteplicità di sierovarianti circolanti di *Staphylococcus aureus*, i vaccini registrati monovalenti si sono dimostrati scarsamente efficaci ed è invece, progressivamente aumentato l'impiego di vaccini stabulogeni polivalenti nella cui formulazione vengono incluse diverse sierovarianti di *S. aureus* isolate in stalla o nel territorio dove sono ubicati gli allevamenti. Scopo della nostra ricerca è stato, pertanto, caratterizzare con tecniche biomolecolari i vari ceppi mastitogeni circolanti, isolati in Istituto e soprattutto valutare la loro capacità di esprimere i geni codificanti le principali enterotossine (SEs), responsabili di gravi tossinfezioni alimentari nell'uomo. Tale attività è stata finalizzata all'individuazione dei principali ceppi patogeni, immunogeni, da impiegare nella formulazione di un presidio immunizzante mirato alla pre-

venzione della diffusione dell'infezione negli animali e nell'uomo. A tutt'oggi sono state identificate numerose SEs da *S. aureus* isolato dal latte di ovini affetti da mastite. L'indagine biomolecolare impiegata per la caratterizzazione dei ceppi mastitogeni di *S. aureus*, è stata eseguita mediante una multiplex-PCR utilizzando una serie di primers specifici per l'amplificazione dei geni codificanti le enterotossine SEA, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL. Da un totale di 241 ceppi di *S. aureus* analizzati a partire da colonie batteriche, 186 (77,1%) sono risultati positivi ad almeno un tipo di enterotossina. In particolare 143 campioni (59,33%) hanno espresso entrambe le enterotossine SEC e SEL, l'enterotossina SEI è stata individuata in 39 campioni (16,18%), mentre solo 4 ceppi (1,66%) sono risultati positivi alla SEG sempre comunque associata alla SEI. Tutti i ceppi sono risultati negativi alle enterotossine SEA, SED, SEJ, SEH.

Dall'analisi dei dati ottenuti è emerso che i ceppi di *S. aureus* circolanti nel territorio di nostra competenza e responsabili di mastite ovina presentano geni codificanti principalmente le enterotossine SEC e SEL, seguite dalla SEI e dalla SEG. Tali informazioni confermano una notevole variabilità genotipica dei ceppi *S. aureus* isolati. Dal momento che lo sviluppo del fenomeno dell'antibiotico-resistenza ha determinato un rinnovato interesse nei confronti della vaccinazione come unico mezzo di prevenzione e lotta alle mastiti ovine da *S. aureus*, è ipotizzabile l'allestimento di un presidio immunizzante che includa nella formulazione i genotipi di *S. aureus* maggiormente diffusi nel territorio.

# Caratterizzazione molecolare dei principali clostridi responsabili di quadri patologici nei piccoli ruminanti



**A. FASANELLA**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

Il genere *Clostridium* comprende ben 166 differenti specie divise in 21 clusters. Molte delle specie patogene, tra cui *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei*, appartengono al cluster I definito *Clostridium sensu stricto* e caratterizzato da una sequenza del DNA ribosomiale altamente conservata. L'identificazione genetica di *Clostridium* è un test diagnostico molto importante anche perché alcuni test biochimici considerati *gold standard method* non sono di facile applicazione. Gli studi di biologia molecolare per questi patogeni riguardano prevalentemente le sequenze di DNA ribosomiale e quelle che codificano la proteina del flagello. Tuttavia solo poche sequenze sono disponibili in banca dati e solo recentemente sono stati pubblicati dati riguardanti la MLST di *Clostridium septicum*. L'analisi delle sequenze del gene della TPI (triose phosphate isomerase) evidenziano un basso grado di coefficiente di similarità rispetto al 16S rDNA. Questi dati confermano la robustezza della TPI come target di differenziazione. Il test real time PCR taqman messo a punto mostra una rapida identificazione e differenziazione tra *Clostridium septicum* e *Clostridium chauvoei* basata sulla individuazione di un non-synonymous SNPs nel gene TPI. Questo studio conferma che gli SNPs sono marker efficaci per l'identificazione di agenti infettivi. Sebbene potenziali mutazioni all'interno del gene possano causare

dei falsi positivi, la struttura clonale suggerisce che questo evento è davvero molto raro. Questo metodo rappresenta un test rapido e sicuro per discriminare non solo *Clostridium chauvoei* da *Clostridium septicum* ma anche da altre specie di clostridi. Comunque l'iniziativa di svolgere una azione di ricerca su questi due batteri nasce dal fatto che il quadro patologico determinato da questi due clostridi è molto simile a quello del carbonchio ematico. Grazie a questo test rapido gli operatori dei reparti di diagnostica potranno conoscere in tempi brevi la natura della morte e di conseguenza adottare misure di protezione individuale adeguate, evitando il rischio di contaminazione dovuto alla sottovalutazione del caso.

## Bibliografia

- Collins M.D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Farrow J. et al. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 812-826.
- Neumann A.P., Rehberger T.G. (2009) MLST analysis reveals a highly conserved core genome among poultry isolates of *Clostridium septicum*. *Anaerobe. Jan*; (15): 99-106.

## La tossinotipizzazione di ceppi di *Clostridium perfringens* ai fini della vaccinazione



G. SEVERI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

La tossinotipizzazione di *Clostridium perfringens* si inserisce in un progetto di tutela e miglioramento della sanità pubblica che si basa su un'analisi dei fattori di patogenicità degli agenti infettivi responsabili di malattie negli animali e nell'uomo. Lo scopo è quello di valutare il grado di diffusione dei vari tipi di *Clostridium perfringens* nel territorio Umbria-Marche e successivamente di sviluppare una adeguata formulazione vaccinale per contrastarne le diffusione. *C. perfringens* è un batterio anaerobio, patogeno facoltativo responsabile di disturbi gastrointestinali, enterotossemie in molte specie animali e di gravi forme di tossinfezioni alimentari nell'uomo. Tale agente microbico viene classificato in cinque tipi A, B, C, D ed E in base alla capacità di produrre le quattro principali esotossine alpha, beta, epsilon e iota ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ).

La metodica diagnostica usata per identificare i vari tossinotipi è stata quella della reazione a catena della polimerasi. È stata messa a punto una *PCR Multiplex* a partire da colonia batterica, che permette di individuare i geni (*cpa*, *cpb1*, *etx*, *iap-ibp*) che codificano rispettivamente per le 4 principali esotossine prodotte e per ulteriori 2 tossine minori (CPE,  $\beta_2$ ), evidenziate recentemente e responsabili di gravi gastroenteriti nell'uomo ed enteriti necrotico-emorragiche in diverse specie animali.

Sono stati identificati 310 ceppi di *C. perfringens* isolati da materiale patologico e da alimenti di origine animale, processati nel nostro Istituto. Il genotipo A è stato identificato nel 69% dei casi, il tossinotipo  $\beta_2$  è stato riscontrato nel 25% dei campioni testati e sempre associato con il tipo A.

Il 3% è risultato di tipo D e il 2% di tipo D in associazione con l'enterotossina CPE. Infine solo l'1% dei campioni è risultato essere di tipo C e non è stata evidenziata la presenza nel nostro territorio dei tossinotipi B ed E.

I dati ottenuti evidenziano la presenza dei nuovi tossinotipi A $\beta_2$  e D CPE le cui tossine non vengono normalmente incluse nella formulazione del vaccino, pertanto all'indagine genotipica si sta associando lo studio delle tossine direttamente coinvolte nella malattia al fine di isolarle, quantificarle e usarle per l'allestimento di vaccini sperimentali.

Constatato infatti che la mancanza di una protezione immunologica crociata completa tra i diversi tossinotipi e che le malattie provocate da tali agenti patogeni non risponde ad alcun trattamento terapeutico, l'unica possibilità per contrastarne la diffusione rimane l'applicazione di una profilassi immunizzante mirata alla specifica situazione epidemiologica.

**Alimenti funzionali:  
quali opportunità**



# I formaggi ovis e caprini: una fonte di acidi grassi funzionali



**M. MELE**

Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema, Sezione di Scienze Zootecniche,  
Università di Pisa

**INTRODUZIONE** - Con il termine alimenti funzionali, che corrisponde alle definizioni in lingua inglese di functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceutical foods, si intende tutti quegli alimenti per cui è dimostrato un ruolo nella prevenzione delle malattie. Il termine functional foods è stato introdotto per la prima volta in Giappone a metà degli anni '80 (Hasler, 1998) e, successivamente, la National Academy of Sciences degli Stati Uniti ha definito come functional food "qualsiasi alimento o ingrediente di alimento che può fornire un beneficio per la salute dell'uomo, al di là del contenuto di nutrienti tradizionali che esso contiene". Al fine di distinguere tra alimenti funzionali e farmaci, nel 1989 la Fondazione per l'Innovazione in Medicina degli Stati Uniti coniò il termine nutraceutica, con il quale si definiva il campo di studio di tutte quelle sostanze che possono essere considerate come alimento o parte di alimento in grado di fornire benefici per la salute, inclusi la prevenzione e la cura delle malattie. In base a queste definizioni gli alimenti nutraceutici non sono farmaci in quanto quest'ultimi sono sostanze farmacologicamente attive in grado di potenziare, essere antagoniste o anche modificare le funzioni fisiologiche e metaboliche (Hardy, 2000).

Negli ultimi dieci anni, sulla base delle scoperte scientifiche che hanno messo in luce i legami fondamentali fra alimentazione e salute umana, è cresciuto l'interesse per gli alimenti funzionali, aumentandone la domanda da parte dei consumatori, sempre più attenti alla disponibilità di alimenti che coniughino un'elevata qualità con la necessità di tutelare la salute. A riprova di questo fatto, recentemente, la Società Italiana di Nutraceutica ha messo in evidenza che il mercato dei cibi funzionali cresce ad un ritmo più elevato degli altri alimenti, superando il 10% annuo e che nel prossimo futuro si prevede che tale trend non diminuirà. Malgrado la maggior parte degli alimenti funzionali sia di origine vegetale, esiste anche un numero significativo di sostanze fisiologicamente attive nei prodotti di origine animale, che hanno evidenziato potenzialità molto interessanti per la tutela della salute umana. Alcune di queste sostanze sono contenute nella frazione lipidica del latte e sono trasferite anche nel grasso dei formaggi e dei latticini, contribuendo a definire le caratteristiche nutraceutiche di questi prodotti. In questa rassegna saranno prese in considerazione le sostanze di natura lipidica, per cui è stato dimostrato un ruolo bioattivo per la salute umana, presenti nel latte prodotto dai piccoli ruminanti, mettendo in evidenza le strategie di allevamento e di alimentazione utili ad aumentarne il contenuto e i possibili riflessi sulla valorizzazione dei prodotti lattiero caseari.

**Il grasso del latte** - Il grasso del latte, a prescindere dalla specie che lo ha prodotto, è costituito prevalentemente da trigliceridi (95-98 g/100 g) e, per la restante parte, da altre classi di lipidi come i fosfolipidi, il colesterolo, i mono e digliceridi, acidi grassi liberi e vitamine liposolubili (Jensen, 2002). Nei trigliceridi sono stati identificati più di 500 acidi grassi differenti, la cui composizione deriva in parte dal prelievo mammario dei lipidi circolanti nel sangue e, in parte, dalla sintesi *de novo* nella ghiandola mammaria (Jensen et al., 2002). Gli acidi grassi più rappresentati sono quelli saturi a catena corta (C4-C10) e media (C12-C16) che, nell'insieme rappresentano più del 50% del totale. L'acido oleico (OA, C18:1 *cis*-9) e l'acido stearico (SA, C18:0) insieme ammontano al 30-35% del to-

tale degli acidi grassi. Meno rappresentati sono gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena che nel grasso del latte sono rappresentati in massima parte dall'acido linoleico (LA, C18:2 n-6) e dall'acido alfa-linolenico (ALA, C18:3 n-3), che insieme rappresentano dal 2.5 al 4% del totale degli acidi grassi. Nel latte si ritrovano anche una significativa quantità di acidi grassi che derivano direttamente o indirettamente dall'attività dei batteri ruminali come gli acidi grassi a catena dispari, quelli ramificati, gli acidi grassi *trans* (TFA) e gli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA). La quantità e il tipo di queste categorie di acidi grassi di origine ruminale che si ritrovano nel latte dipende molto dalla dieta degli animali e dalla specie di ruminante considerata. Nel caso dei piccoli ruminanti, per i quali il sistema di allevamento è spesso di tipo estensivo e l'alimentazione si basa per un ampio periodo dell'anno sul pascolo, la composizione degli acidi grassi del latte differisce da quella del latte bovino per diversi aspetti. Di norma, soprattutto nel caso del latte di capra, il contenuto di acidi grassi a corta catena è più elevato, inoltre la quantità di acido palmitico (C16:0) è più bassa che nel latte di vacca, mentre il contenuto di acidi grassi polinsaturi, di acido vaccenico (VA, C18:1 *trans*-11) e di CLA è più elevata. Va poi sottolineato che il grasso del latte di pecora e di capra contiene piccole, ma significative quantità anche di acidi grassi polinsaturi a catena molto lunga quali l'acido arachidonico (C20:4 n-6), l'EPA (C20:5 n-3) e il DHA (C22:6 n-3), di norma non riscontrabili nel latte vaccino se non in tracce.

Nel complesso, il grasso del latte, anche nel caso dei piccoli ruminanti, non è considerato ben bilanciato per l'alimentazione dell'uomo adulto, a causa dell'elevato livello di acidi grassi saturi e di acidi grassi *trans*, ritenuti fattori di rischio per l'incremento della frazione LDL-plasmatica (Hornstra, 1999). Inoltre, il basso contenuto di acidi grassi omega-3 del latte è considerato non utile a migliorare il rapporto n-6:n-3 della dieta, obiettivo questo ritenuto prioritario per la prevenzione di molte patologie legate al sistema cardiocircolatorio e agli stati infiammatori, soprattutto nei paesi sviluppati dove l'abuso di alimenti ricchi di acidi grassi omega-6 ha portato il rapporto sopra citato a valori molto superiori a quello ritenuto ottimale (Simopoulos, 1999). Malgrado queste caratteristiche ritenute sfavorevoli, il grasso del latte e, in particolare quello del latte di pecora e di capra, contiene numerose componenti che possono svolgere un ruolo importante nella tutela della salute umana. Il contenuto di queste sostanze, presenti già naturalmente nel grasso, può essere opportunamente incrementato e, in particolare, nel caso dei CLA del VA, degli acidi grassi omega-3 e degli acidi grassi ramificati di cui è noto il potenziale valore positivo nei confronti della salute umana (Parodi, 1997; Wongtangtharn et al., 2004; Parodi, 2005).

**Acido linoleico coniugato (CLA).** Con il termine CLA ci si riferisce a un gruppo di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico, accomunati dal fatto di avere i due doppi legami coniugati. L'isomero CLA più rappresentato nel grasso del latte dei ruminanti è il *cis*-9, *trans*-11 CLA, chiamato anche acido rumenico. Questo isomero origina da due distinte vie metaboliche: 1) la bioidrogenazione ruminale del LA nel rumine e 2) la desaturazione a livello del tessuto ghiandolare mammario del VA, che, a sua volta, origina dai processi di bioidrogenazione ruminale del LA e dell'ALA. La prima

via biosintetica prevede una lipolisi preliminare dei trigliceridi contenuti nella dieta dell'animale e, successivamente, la riduzione degli acidi grassi insaturi da parte dei batteri ruminali. Inizialmente si pensava che solo il batterio *Butyrivibrio fibrisolvens* fosse in grado di svolgere le bioidrogenazioni ruminali che stanno alla base della formazione di CLA (Kepler *et al.*, 1967). In seguito sono stati individuati altri microrganismi attivi in questo senso quali: *Eubacterium lentum*, *Propionibacterium freudenreichi*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Megasphaera elsdeni* e *Bifidobacterium breve* (Fukuda *et al.*, 2005). Studi su colture cellulari pure hanno dimostrato che l'intero processo di bioidrogenazione che parte dall'acido grasso insaturo presente nella dieta e arriva alla forma satura corrispondente (l'acido stearico C18:0), non è svolto da un singolo ceppo di microrganismi, ma deve essere coordinato da un pool di batteri ruminali, ognuno in grado di controllare una parte del processo. Questo consorzio di microrganismi può essere classificato in due gruppi: batteri del gruppo A, in grado di idrogenare il LA e l'ALA a VA e i batteri del gruppo B, che concludono la sequenza di bioidrogenazione, riducendo il VA ad acido stearico (Harfoot and Hazlewood, 1988). Lo step iniziale della sintesi di CLA nel ruminante prevede l'isomerizzazione del *cis*-9, *cis*-12 C18:2 (LA) a *cis*-9, *trans*-11 CLA (Harfoot, 1978). Questo passaggio è catalizzato dall'enzima linoleico-isomerasi, che non necessita di cofattori e agisce sul doppio legame localizzato a metà della catena carboniosa e più lontano dal gruppo funzionale. Questo enzima, localizzato sulla superficie della membrana cellulare, è molto selettivo in quanto riconosce solo i dieni del tipo *cis*-9, *cis*-12 presenti lungo la catena carboniosa di un acido grasso libero. Il secondo step prevede la riduzione del CLA a *trans*-11 C18:1 (VA), con una reazione veloce. L'ultimo step, quello da VA a C18:0 è, al contrario, molto più lento, tanto da essere considerato il rate determining step dell'intero processo, consentendo l'accumulo di VA a livello ruminale e il passaggio di questo acido grasso al plasma ematico attraverso il processo di assorbimento intestinale. Recentemente sono stati identificati nuovi ceppi di *B. fibrisolvens* con un'elevata efficienza di produzione di CLA e VA, nel tentativo di incrementare l'accumulo ruminale di questi due acidi grassi. (Fukuda *et al.*, 2005; Fukuda *et al.*, 2006). Alcuni recenti studi condotti su liquido ruminale hanno inoltre consentito di evidenziare che alcune sostanze naturali come i tannini potrebbero consentire di modulare il processo di bioidrogenazione ruminale favorendo l'accumulo di VA a discapito della formazione di acido stearico (Vasta *et al.*, 2009). Dopo che il VA è stato assorbito a livello intestinale e giunge alla ghiandola mammaria tramite il flusso plasmatico, avviene una conversione del VA ad acido rumenico per azione dell'enzima mammario<sup>9</sup> desaturasi. Studi su vacche da latte hanno dimostrato che questa seconda via di produzione di CLA fornisce più dell'80% dell'acido rumenico presente nel grasso del latte (Corl *et al.*, 1998).

Il regime alimentare del gregge rappresenta il principale fattore di variazione del contenuto di CLA nel latte dei ruminanti. Di norma, diete basate sul pascolo o che prevedono l'integrazione dei mangimi con oli polinsaturi di origine vegetale o marina consentono i maggiori incrementi di CLA e di VA nel grasso del latte. In questi casi il contenuto di CLA del latte può superare il 2% del totale degli acidi grassi (Mele e Banni, 2010). In genere esiste una relazione lineare tra l'assunzione di oli vegetali insaturi e il contenuto di CLA nel latte di pecora, confermata da diversi studi (Luna *et al.*, 2005; Mele *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Mele *et al.*, 2007; Gomez-Cortes *et al.*, 2008b). Il contenuto di VA del latte è fortemente correlato a quello di CLA, in quanto la maggior parte del CLA presente nel latte, come evidenziato in precedenza, origina dalla desaturazione mammaria del VA.

I CLA hanno ricevuto una grande attenzione da parte della ricerca in nutrizione, in virtù del fatto che numerose evidenze sperimentali hanno messo in luce per questa classe di sostanze proprietà anticancerogene, antiaterosclerotiche, antidiabetiche, ed immunomodulanti. Inoltre, alcuni isomeri CLA hanno evidenziato anche effetti significativi sulla composizione corporea inducendo un aumento del-

la massa magra a discapito di quella grassa (Bhattacharya *et al.*, 2006). La maggior parte degli studi, svolti prevalentemente negli ultimi dieci anni, hanno evidenziato tali proprietà nell'ambito di modelli animali o in vitro, ma recentemente si stanno acquisendo anche dati relativi a studi condotti sull'uomo (per una rassegna completa della bibliografia vedere il sito <http://fri.wisc.edu/clarefs.htm>). Gli studi su modelli animali e su colture cellulari hanno consentito di definire il CLA come una sostanza dalle proprietà nutraceutiche e, in alcuni casi, anche di proporre quantità ben definite da assumere affinché tali proprietà vengano esplicate. Ad esempio sulla base dei primi studi condotti sul carcinoma mammario in modelli animali, la dose di CLA considerata protettiva era considerata di circa 3 g/d (Ip *et al.*, 1999). Più recentemente, sulla base di estrapolazioni relative al peso metabolico degli animali da esperimento e a quello di una persona di 70 kg di peso e in buona salute, la dose di CLA considerata efficace ai fini di ottenere un'azione positiva sulla salute umana è stata stimata tra i 700 e gli 800 mg/d (Bauman *et al.*, 2006). In realtà non è ancora chiaro quale sia la dose giornaliera di CLA raccomandabile. Allo stato attuale si suppone che sia di almeno 1 g/d la quantità minima di CLA da ingerire giornalmente, affinché tale sostanza possa espletare effetti positivi sulla salute umana, quantomeno nel caso delle malattie cardiovascolari (Banni, comunicazione personale). È indubbio, tuttavia, che maggiori studi sono necessari per stabilire con maggiore certezza le quantità di CLA da ingerire e, soprattutto, per definire con chiarezza il ruolo differenziale dei diversi isomeri. Un punto su cui, infatti, si registra un pieno accordo tra gli studiosi è che le azioni biologiche ascritte al CLA sono differenti e, in alcuni casi, addirittura contrastanti a seconda dell'isomero CLA che si prende in considerazione. Questo è il motivo principale per cui i primi studi condotti sull'uomo utilizzando miscele di isomeri di CLA non hanno evidenziato alcun effetto positivo (Tricon *et al.*, 2005). È stato dimostrato, infatti, che l'isomero *cis*-9, *trans*-11 CLA (chiamato anche acido rumenico e naturalmente presente nel latte e nella carne dei ruminanti) svolge un'azione positiva sulla colesterolemia, diminuendo il rapporto LDL:HDL. Al contrario tale rapporto si innalza al seguito della somministrazione dell'isomero *trans*-10, *cis*-12 CLA, scarsamente presente nei prodotti dei ruminanti, se non a seguito dell'applicazione di diete particolari, ma che rappresenta circa il 50% delle miscele di isomeri in commercio per l'applicazione in trial clinici (Tricon *et al.*, 2004). Da queste conoscenze nasce l'esigenza di valutare l'effetto del CLA prendendo in considerazione i singoli isomeri o gli alimenti arricchiti in maniera selettiva con un isomero specifico.

A questo proposito, alcuni recenti trial clinici hanno evidenziato effetti positivi significativi su alcuni parametri ematici legati allo stato infiammatorio a seguito della somministrazione, a persone di entrambi i sessi e in salute, di formaggio pecorino naturalmente arricchito in acido rumenico (Sofi *et al.*, 2010). Un altro studio, condotto su uomini di età compresa tra 34 e 60 anni e in buona salute, ha messo in evidenza che l'inserimento nella dieta di formaggi e latticini arricchiti con acido rumenico, in maniera da fornire circa 1.4 g/d di questa sostanza, non comportava alcuna variazione significativa nel rischio di malattie cardiovascolari, contrariamente a quanto atteso in funzione delle linee guida per una sana alimentazione comunemente condivise nei paesi occidentali (Tricon *et al.*, 2006). In effetti, la maggiore fonte alimentare di CLA nella dieta dell'uomo è rappresentata dai prodotti lattiero caseari che coprono più del 70% della quantità mediamente ingerita di questa sostanza nell'arco di una giornata (Bauman *et al.*, 2006). L'assunzione di prodotti lattiero caseari comporta l'ingestione anche di una significativa quantità di VA, che viene convertito ad acido rumenico nei tessuti tramite l'azione dell'enzima<sup>9</sup> desaturasi. Tenendo in considerazione anche il contributo della conversione del VA ad acido rumenico (circa il 20% del VA viene convertito in acido rumenico a livello tissutale nell'uomo), la quantità media di CLA che si stima possa essere ingerita giornalmente nell'ambito di una dieta equilibrata varia da 140-420 mg/d (Bauman *et al.*, 2006). Sulla base di questa stima, una quantità di circa 1 g/d potrebbe essere raggiunta attraverso

so l'inserimento nella dieta di prodotti lattiero caseari opportunamente arricchiti con CLA e VA. Inoltre, l'uso di formaggi e latticini arricchiti può contribuire a ridurre anche l'ingestione di acidi grassi saturi, in quanto è dimostrato che l'arricchimento con VA e CLA comporta, di norma, anche una diminuzione del contenuto di acidi grassi saturi del latte (Mele, 2009).

**Acido butirrico.** L'acido butirrico, presente esclusivamente nel grasso del latte dei ruminanti è considerato un agente anticancerogeno che induce differenziazione e apoptosi in cellule tumorali e inibisce la proliferazione cellulare e l'angiogenesi (Parodi, 2005). Inoltre, al pari degli altri acidi grassi saturi a catena corta e diversamente da quanto riportato per gli acidi grassi saturi a media catena, non contribuisce in maniera significativa all'innalzamento del colesterolo ematico (Steijns, 2008). Il contenuto di acido butirrico del grasso del latte è alquanto stabile (varia dal 4-5% del grasso del latte), non essendo influenzato dal regime alimentare degli animali. Questo è dovuto al fatto che la sintesi di acido butirrico è slegata dal processo di condensazione di più molecole di acetato operato dall'enzima sintasi degli acidi grassi, da cui, al contrario, dipende la sintesi degli altri acidi grassi a corta e media catena presenti nel latte (Palmquist et al., 1993). Nei trigliceridi del grasso del latte l'acido butirrico viene esterificato esclusivamente in posizione sn-3 del glicerolo e circa un terzo dei trigliceridi del latte contengono questo acido grasso. L'azione anticancerogena dell'acido butirrico sembra sia svolta in sinergia con altri agenti anticancerogeni quali la vitamina A, la vitamina D e il resveratrolo. Questo fatto consente all'acido butirrico di svolgere la propria azione bioattiva anche a concentrazioni plasmatiche relativamente basse (Parodi, 2005).

**Acidi grassi ramificati (BCFA).** La composizione degli acidi grassi dei batteri ruminali è caratterizzata da un significativo contenuto di acidi grassi a catena dispari e ramificata localizzati a livello della membrana lipidica (C15:0; iso C15:0; anteiso C15:0; C17:0; iso C17:0; anteiso C17:0; C17:1) (Vlaemink et al., 2005). Tali acidi grassi si ritrovano anche nel grasso del latte dei ruminanti, specialmente in quello di pecora e capra. La sintesi di questi acidi grassi è stata studiata nei batteri ruminali fornendo carbonio marcato ( $^{14}\text{C}$ ) alle colture cellulari. La disponibilità di acetato consente ai batteri di sintetizzare acidi grassi a catena pari, mentre la presenza di propionato e di valerato porta alla sintesi di acidi grassi a catena dispari. La sintesi di acidi grassi a catena ramificata, invece, è conseguente alla disponibilità di altri precursori quali l'isobutirrato, l'isovalerato e il 2-metilbutirrato (Vlaeminck et al., 2006). La forma iso e anteiso del C15:0, l'iso C16:0 e la forma iso e anteiso del C17:0 sono i principali BCFA presenti nel grasso del latte dei piccoli ruminanti (Massart-Leen et al., 1983). Questi acidi grassi e, più ancora, i BCFA a corta catena sono responsabili del tipico aroma dei prodotti lattiero caseari dei piccoli ruminanti, in special modo per la capra, ma il loro interesse riguarda anche altri aspetti, tra cui alcune proprietà utili per la salute umana. È stato dimostrato che i BCFA hanno proprietà citotossiche nei confronti delle cellule tumorali della mammella (Wongtangtharn et al., 2004). Inoltre la forma iso C15:0 ha azione inibente e induce apoptosi in diverse forme di cellule cancerogene quali quelle del carcinoma alla prostata, quelle leucemiche e quelle dell'adenocarcinoma mammario (Yang et al., 2000). Tale attività bioattiva sembra sia paragonabile a quella dimostrata per un'altra classe di acidi grassi ad azione antitumorale quali i CLA. Anche in questo caso il regime alimentare degli animali è il maggior fattore di variazione del contenuto di BCFA del latte. L'aumento della proporzione di foraggi nella dieta generalmente comporta un aumento dei BCFA, in particolare delle forme iso C14:0 e iso C15:0 (Mele et al., 2008).

**Acidi grassi Omega-3.** Questa categoria di acidi grassi è presente nel grasso del latte dei piccoli ruminanti in quantità limitate e quasi esclusivamente sotto forma di ALA. Tale acido grasso è presente nel grasso del latte in quantità di norma inferiori all'1% nel caso di regimi alimentari basati su foraggi conservati e mangimi non contenenti fonti lipidiche ricche in omega-3. Nei periodi di grande disponibilità di pascolo, l'elevato contenuto di ALA nell'erba (soprattutto nel

periodo primaverile) comporta un aumento del contenuto di tale acido grasso anche nel grasso del latte, portandolo a valori compresi tra l'1 e il 2% (Mele, 2009). Solo in alcuni casi particolari, a causa della presenza nel pascolo di erbe particolarmente ricche in tannini come la sulla, i valori di ALA possono superare il 2% (Cabiddu et al., 2005). L'aumento del contenuto di ALA nel grasso del latte dei piccoli ruminanti è stato osservato anche in conseguenza della somministrazione di mangimi contenenti semi di lino interi nella razione degli animali. In tal caso il livello di ALA nel latte ha raggiunto valori anche superiori al 2% degli acidi grassi (Mele et al., 2007).

Gli acidi grassi omega-3 a più lunga catena come l'EPA e il DHA, che derivano dall'allungamento e dalla desaturazione dell'ALA, sono contenuti nel grasso del latte in quantità assai modeste (tra 0.1 e 0.2%), come conseguenza del fatto che il processo di allungamento e desaturazione dell'ALA ad opera degli enzimi mammari elongasi e desaturasi è poco efficiente e, inoltre, tali acidi grassi vanno ad esterificare, preferenzialmente, i fosfolipidi che sono contenuti in quantità minori dell'1% nel grasso del latte.

L'interesse per gli acidi grassi omega-3 come composti bioattivi è legato al ruolo svolto nella prevenzione delle patologie cardio-circolatorie e come sostanze ad azione antinfiammatoria. La maggior parte delle evidenze sperimentali riguarda gli acidi grassi omega-3 a lunga catena quali EPA e DHA. Per essi sono stati dimostrati effetti benefici sull'aggregazione piastrinica e la coagulazione del sangue, sul livello di trigliceridi ematici e sulla risposta infiammatoria (de Deckere et al., 1998). In realtà, recentemente è stato rivalutato anche il ruolo dell'ALA, non tanto e non solo come precursore dell'EPA e del DHA (per altro nell'ambito di una via metabolica poco efficiente che, di fatto, comporta la necessità di assumere tali acidi grassi per via esogena al fine di sopperire ai fabbisogni metabolici dell'uomo), ma piuttosto come sostanza che, di per sé, ha evidenziato un'azione benefica rispetto ad alcuni aspetti della salute umana, in particolare in relazione al controllo del colesterolo ematico. A riprova di ciò, recentemente, la massima autorità scientifica europea in materia di sicurezza e qualità alimentare (EFSA) ha stabilito dei fabbisogni giornalieri di ALA per ciascuna classe di individui, proprio in virtù delle dimostrate funzioni ipo-colesterolemiche dell'ALA (EFSA, 2009). Secondo il parere espresso dall'EFSA la quantità giornaliera di ALA necessaria per svolgere la propria funzione benefica è rappresentata dal 2 g/d e, sulla base di questa stima, tutti gli alimenti in grado di apportare almeno il 15% di questa quantità in 100 g di prodotto sono definibili come una fonte di omega-3. Questo aspetto potrebbe essere opportunamente utilizzato per la valorizzazione dei formaggi prodotti durante il periodo di pascolamento delle capre e delle pecore. Infatti, assumendo un contenuto di grasso del formaggio pari al 26-28% e una quantità di ALA pari a 1.2 g/100 g di grasso, la quantità di ALA contenuta in 100 g di formaggio supererebbe 0.3 g, cioè il 15% della dose giornaliera raccomandata. Questa tipologia di formaggi, pertanto, potrebbe avvalersi della dizione "fonte di omega-3", proprio in virtù del contenuto di ALA naturalmente presente in questi prodotti durante il periodo di pascolamento primaverile.

**CONCLUSIONI** - Il grasso del latte dei piccoli ruminanti contiene naturalmente diverse sostanze che hanno dimostrato di possedere proprietà benefiche per la salute umana. Tal aspetto va a controbilanciare le critiche spesso rivolte ai formaggi e latticini in virtù del loro contenuto di acidi grassi ad azione ipercolesterolemizzante. Il contenuto di sostanze ad azione nutraceutica del latte può essere opportunamente potenziato attraverso sistemi di alimentazione naturali e rispettosi del benessere degli animali. Un ruolo centrale in questo senso è svolto dall'alimentazione al pascolo e dall'ottimizzazione delle tecniche di pascolamento. Le caratteristiche pedoclimatiche dell'Italia centro-meridionale, tuttavia, non consentono di disporre per lunghi periodi del pascolo come risorsa alimentare e, pertanto, è necessario applicare strategie nutrizionali integrative che garantiscano livelli costanti di arricchimento del latte durante l'intera stagione produttiva. In tal senso l'introduzione di fonti di grasso vegetale nella dieta dei piccoli ruminanti si è dimostrata una strategia efficace.

## Bibliografia

- Bauman, D.E., Lock, A.L., Corl, B.A., Ip, C., Salter, A.M., Parodi, P.W. 2006. Milk fatty acids and human health: potential role of conjugated linoleic acid and trans fatty acids. In: Sejrsen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (eds.). *Ruminant physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 529-562.
- Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem*. 17(12), 789-810.
- Cabiddu, A., Decandia, M., Addis, M., Piredda, G., Pirisi, A., Molle, G. 2005. Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk. *Small Rum. Res*. 59, 169-180.
- Corl, B.A., Chouinard, P.Y., Bauman, D.E., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Nurmela, K.V. 1998. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originate in part by endogenous synthesis from trans-11 octadecenoic acid. *J. Dairy Sci*. 82, 2737-2745.
- de Deckere, E.M., Korver, O., Verschuren, P., Katan, M.B. 1998. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur. J. clin. Nutr*. 52, 749-753.
- EFSA. 2009. Labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *The EFSA Journal*. 1176, 1-11.
- Fukuda, S., Furuya, H., Suzuki, Y., Asanuma, N., Hino, T. 2005. A new strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that has high ability to isomerize linoleic acid to conjugated linoleic acid. *J. Gen. Appl. Microb*. 51, 105-113.
- Fukuda, S., Suzuki, Y., Asanuma, N., Hino, T. 2006. Augmentation of vaccinate production and suppression of vaccinate biohydrogenation in cultures of mixed ruminal microbes. *J. Dairy Sci*. 89, 1043-1051.
- Gomez-Cortes, P., P. Frutos, A.R. Mantecon, M. Juarez, M.A. de la Fuente, and G. Hervás, 2008b. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J. Dairy Sci*. 91, 1560-1569.
- Hardy, G. 2000. Nutraceuticals and Functional Foods: Introduction and Meaning. *Nutrition*, 16, 688-689.
- Harfoot, C.G. 1978. Lipid metabolism in the rumen. *Prog. Lipid Res*. 17, 21-54.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. (ed.) *The Rumen Microbiology Ecosystem*. Elsevier, London, pp. 285-322.
- Hasler, C.M., 1998. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Tech*. 52, 57-62.
- Hornstra, G., 1999. Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Fett/Lipid*. 101, 456-466.
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H. J., Barbano, D. & Bauman, D. (1999) Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr*. 129, 2135-2142.
- Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci*. 85, 295-350.
- Kepler, C.R., Hiron, K.I., McNeill, P.H., Tove, S.B. 1967. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem*. 241, 1350-1354.
- Luna, P., J. Fontecha, M. Juarez, and M.A. de la Fuente, 2005. Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids*. 40, 445-454.
- Massart-Leen, A.M., Roets, E., Peeters, G., Verbeke, R. 1983. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci*. 66, 1445-1454.
- Mele M., Banni S. 2010. Lipid supplementation in small ruminant nutrition and dairy products quality: implications for human nutrition. *Atti 3rd Eaap International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition*. Parma (Italy), 6 -10 September 2010. (in press).
- Mele M., Buccioni A., Serra A., Antongiovanni M., Secchiari P. 2008. Lipids of goat's milk: origin, composition and main sources of variation. In A. Cannas, and G. Pulina (eds) *Dairy Goats Nutrition and Feeding*. CAB International. Wallingford UK. Pp. 47-70.
- Mele M., Serra A., Conte G., Pollicardo A., Del Viva M., Secchiari P. (2007). Whole extruded linseed in the diet of dairy ewes during early lactation: effect on the fatty acid composition of milk and cheese. *Ital. J. Anim. Sci*. 6 (suppl. 1), 560-562.
- Mele, M., 2009. Designing milk fat to improve healthfulness and functional properties of dairy products: from feeding strategies to a genetic approach. *It. J. Anim. Sci*. 8 (suppl.2), 365-373.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., Secchiari, P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Anim. Res*. 55, 273-285.
- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci*. 76, 1753-1771.
- Parodi, P.W. 2005. Dairy Product Consumption and the Risk of Breast Cancer. *J. Am. Coll. Nutr.*, 24, 556S-568S.
- Parodi, P.W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr*. 127, 1055-1060.
- Simopoulos, A.P., 1999. New products from the Agri-Food industry: the return of n-3 fatty acids into the food supply. *Lipids*, 34, suppl., S297-S301.
- Sofi, F., A. Buccioni, F. Cesari, A.M. Gori, S. Minieri, L. Mannini, A. Casini, G.F. Gensini, R. Abbate, and M. Antongiovanni, 2010. Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: a dietary intervention study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20, 117-124.
- Steijns, J.M. 2008. Dairy products and health: focus on their constituents or on the matrix? *Int. Dairy J*. 18, 425-435.
- Tricon, S., Burdge, G. C., Jones, E. L., Russell, J. J., El-khazen, S., Moretti, E., Hall, W. L., Gerry, A. B., Leake, D. S., Grimble, R. F., Williams, C. M., and Calder, P. C. 2006. Conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy. *Am. J. Clin. Nutr*. 83, 744-753.
- Tricon S, Burdge GC, Williams CM, Calder PC, Yaqoob P. The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2005. 64, 171-182.
- Tricon, S., G.C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J.J. Russell, E.L. Jones, R.F. Grimble, C.M. Williams, P. Yaqoob, and P.C. Calder, 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr*. 80, 614-620.
- Vasta V, Makkar HP, Mele M, Priolo A. 2009. Ruminant biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *Brit. J. Nutr*. 102, 82-92.
- Vlaeminck, B., Dufour, C., van Vuuren, A.M., Cabrita, A.M.R., Dewhurst, R.J., Demeyer, D., Fievez, V. 2005. Potential of odd and branched chain fatty acids as microbial markers: evaluation in rumen contents and milk. *J. Dairy Sci*. 88, 1031-1041.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., Dewhurst, R.J. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Tech*. 131, 389-417.
- Wongtangtitharn S, Oku H, Iwasaki H, Toda T. (2004). Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J Nutr Sci Vitamin*. 50, 137-143.
- Yang, Y., Shangpei, L., Chen, H., Huang, M., Zheng, J. 2000. Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer res*. 60, 505-509.
- Zhang, R., A.F. Mustafa, and X. Zhao, 2006. Effects of flaxseed supplementation to lactating ewes on milk composition, cheese yield, and fatty acid composition of milk and cheese. *Small Rum. Res*. 63, 233-241.



# Gli alimenti funzionali ed il loro rapporto con la salute dell'uomo



M. ROSELLI

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN)  
Area Scienze della Nutrizione

La moderna scienza dell'alimentazione è andata oltre il concetto classico di evitare carenze nutrizionali e di promuovere una nutrizione di base adeguata, evolvendo verso il concetto di alimentazione "positiva" od "ottimale", come anche richiesto dall'aumentato interesse dei consumatori verso il binomio alimentazione-salute. Molta ricerca è oggi incentrata sull'identificazione dei componenti alimentari biologicamente attivi, potenzialmente in grado sia di ottimizzare il benessere fisico e mentale, sia di ridurre il rischio o ritardare l'insorgenza, di gravi patologie quali le malattie cardiovascolari, il cancro e l'osteoporosi, i cosiddetti **alimenti funzionali**. L'insieme degli alimenti funzionali si presenta notevolmente eterogeneo, in quanto include: frutta e verdura di tutte le varietà, thé verde, aglio e cipolla, soia, cereali integrali, latte e prodotti fermentati. Le componenti funzionali attualmente individuate in tali alimenti sono: acidi grassi monoinsaturi (Omega 3: acido  $\alpha$ -linolenico, acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico), carotenoidi ( $\beta$ -carotene, luteina, licopene), fibre alimentari insolubili ( $\beta$ -glucani), fitoestrogeni (isoflavoni), fitosteroli, isotiocianati, sulfili, tioili, prebiotici (inulina, FOS-fruttoligosaccaridi, GOS-galattoligosaccaridi) e soprattutto probiotici (principalmente lattobacilli e bifidobatteri). In base alla loro attività specifica, gli alimenti funzionali possono essere raggruppati in cinque categorie principali: a) alimenti che contribuiscono a migliorare il sistema immunitario, potenziandone i meccanismi di difesa; b) alimenti che contribuiscono a controllare o impedire malattie come quelle cardiache e diabetiche; c) alimenti che contribuiscono a ridurre il livello di colesterolo; d) alimenti che aiutano la digestione o incrementano l'assorbimento intestinale di vitamine e minerali; e) alimenti che aiutano a ridurre l'invecchiamento.

**I PROBIOTICI** - Gli alimenti funzionali che agiscono sul sistema immunitario sono soprattutto i probiotici, contenuti tipicamente nei prodotti fermentati, come lo yogurt. La definizione di probiotico oggi comunemente accettata, stabilita da WHO (World Health Organization) e FAO (Food and Agriculture Organization), è la seguente: "microorganismi vivi che, se consumati in adeguata quantità, conferiscono effetti benefici alla salute dell'ospite" (WHO e FAO, 2001). Il primo batterio usato come probiotico è stato *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, impiegato dalla popolazione bulgara per la produzione di yogurt. Altri lattobacilli attualmente utilizzati nei preparati probiotici sono: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. reuterii*; invece tra i bifidobatteri si annoverano: *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. A questi si aggiungono batteri appartenenti ad altri generi microbici, quali *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. lactis*), *Leuconostoc*, *Propionibacterium* e *Bacillus*.

I requisiti che contraddistinguono un microorganismo come probiotico sono: a) colonizzazione, anche transiente, nell'intestino dell'uomo; b) sicurezza d'uso nell'uomo; c) stabilità a valori estremi di pH e ad elevate concentrazioni di sali biliari; d) resistenza alla digestione da parte di enzimi enterici e pancreatici; e) buona durata nel tempo.

I meccanismi mediante i quali i probiotici influenzano positivamente la salute dell'ospite sono molteplici, i più noti includono: a) competizione con i batteri patogeni per i nutrienti e per i siti di adesione lungo la mucosa intestinale; b) produzione di sostanze ad

azione antimicrobica, chiamate batteriocine; c) azione immunostimolante ed immunomodulante; d) miglioramento della tolleranza al lattosio, grazie all'elevata attività  $\beta$ -galattosidasi; e) sintesi di vitamine, quali acido pantotenico, biotina, piridossina, menachinone e digestione delle fibre insolubili (O'Hara & Shanahan, 2007).

La maggior parte degli studi per verificare gli effetti benefici dei probiotici sono stati condotti sull'uomo. Esistono comunque probiotici anche destinati ad impiego veterinario. L'uso di probiotici nell'alimentazione animale ha scopi essenzialmente produttivi in quanto la loro assunzione determina un incremento della velocità di sviluppo dell'animale, una riduzione dell'incidenza di infezioni subcliniche, un miglioramento della capacità di utilizzo del cibo dovuta agli enzimi prodotti dai probiotici, ed un incremento dei quantitativi di uova e latte prodotti.

**PREBIOTICI E SIMBIOTICI** - I prebiotici sono componenti non digeribili di alcuni alimenti, essenzialmente carboidrati, in grado di stimolare selettivamente la crescita e/o l'attività metabolica di alcuni probiotici, fungendo da substrato nutritivo. Affinché ciò sia possibile, tali sostanze non devono essere né idrolizzate né assorbite nel primo tratto dall'apparato gastrointestinale, rimanendo in tal modo disponibili per essere fermentate nel colon. La fermentazione dei prebiotici porta alla formazione degli acidi grassi a catena corta (SCFA, *short chain fatty acids*), con conseguente abbassamento del pH, che favorisce la crescita dei bifidobatteri e dei lattobacilli, ben adattati a questa condizione restrittiva, mentre gli SCFA svolgono un ruolo importante per il funzionamento degli enterociti (Gibson & Roberfroid, 1995). Le conoscenze sui prebiotici e sui probiotici hanno poi dato luogo alla realizzazione di simbiotici, formulazioni nelle quali probiotici e prebiotici sono usati in combinazione, per sfruttare sinergicamente gli effetti benefici di entrambi. I simbiotici mirano al miglioramento della sopravvivenza di alcuni probiotici nel tratto gastrointestinale, in quanto il substrato fermentabile, necessario per la colonizzazione nell'intestino da parte del microorganismo, risulta immediatamente disponibile. Le potenziali combinazioni che si possono ottenere tra le differenti specie batteriche di probiotici disponibili e i vari tipi di prebiotici sono numerose, ma tutt'oggi sono ancora pochi gli studi scientifici che dimostrino l'eventuale attività additiva o sinergica della combinazione.

**IL MICROBIOTA INTESTINALE** - L'apparato gastrointestinale, in particolare il colon, ospita un numero elevatissimo di microorganismi che, nel loro complesso, costituiscono il cosiddetto microbiota intestinale. Il numero complessivo di cellule del microbiota intestinale umano supera di dieci volte quello delle cellule eucariotiche del nostro organismo. La maggior parte di queste cellule è viva e metabolizzante ed influenza numerose attività biochimiche, immunologiche e fisiologiche dell'ospite, arrivando ad avere un impatto determinante sulla salute. L'apparato gastrointestinale fetale è un ecosistema sterile, che comincia ad essere colonizzato dai microorganismi presenti nell'ambiente al momento del parto. I primi colonizzatori sono i batteri opportunisti aerobi e anaerobi facoltativi, come *Escherichia coli* e *Streptococcus*, successivamente colonizzano gli anaerobi stretti, quali *Bacteroides*, *Clostridium* e *Bifidobacterium*. Nel neonato durante l'allattamento la presenza di *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ed *Enterococchi* aumenta, a discapito delle *Enterobacteriaceae*, il cui numero cala drasticamente. Entro i due

anni di vita la composizione del microbiota intestinale si consolida e rimane sostanzialmente stabile nell'adulto, a meno di perturbazioni occasionali dovute, ad esempio, a diarrea o a trattamento antibiotico. Durante l'invecchiamento la composizione del microbiota intestinale subisce invece profonde alterazioni. Nonostante il conteggio medio degli anaerobi totali rimanga relativamente stabile nella popolazione anziana, si verificano alcune variazioni nella composizione dei diversi generi, accompagnate da una riduzione generale nella diversità della specie. Numerosi studi riportano da una parte un declino nella conta vitale e nella diversità del genere *Bacteroides* e di molti anaerobi commensali, soprattutto bifidobatteri e, in minor misura, lattobacilli, e dall'altra un incremento nel numero di batteri patogeni, appartenenti al genere *Clostridia* e *Eubacteria* (Hebuterne 2003; Woodmansey *et al.*, 2004).

**MANTENIMENTO DELLA BARRIERA INTESTINALE DA PARTE DEI PROBIOTICI** - Il mantenimento della barriera mucosale è fondamentale per l'omeostasi intestinale, in quanto evita il passaggio indiscriminato di patogeni e antigeni nocivi dal lume intestinale, con conseguente insorgenza di stati infiammatori. I probiotici svolgono un ruolo importante nel mantenimento della funzionalità della barriera, che si esplica sia riducendo l'adesione dei patogeni agli enterociti, sia interagendo con il sistema immunitario intestinale. Nel nostro laboratorio sono stati effettuati vari studi *in vitro* sull'azione anti-infiammatoria e immunomodulatoria di alcuni probiotici su cellule intestinali infettate con il batterio patogeno *E. coli* enterotossico (ETEC) K88. I probiotici *Bifidobacterium animalis* MB5 e LGG proteggevano le cellule intestinali umane Caco-2 dai danni infiammatori indotti da ETEC, riducendo l'adesione del patogeno e la migrazione dei neutrofili, attraverso modulazione dell'espressione di citochine e chemiochine (Roselli *et al.*, 2006). Il "nuovo" probiotico *L. sobrius* (attuale definizione: *L. amylovorus*), isolato dall'intestino del maiale, proteggeva le cellule intestinali porcine IPEC-1 da ETEC mantenendo l'integrità della barriera epiteliale attraverso la modulazione delle citochine IL-8 e IL-10 (Roselli *et al.*, 2007).

**PROTEZIONE DELLA INFIAMMAZIONI INTESTINALI** - Sebbene la composizione del microbiota sia stabile e ben bilanciata, alcuni probiotici, soprattutto lattobacilli e bifidobatteri, possono essere introdotti temporaneamente nel colon a scopo terapeutico o preventivo. L'uso dei batteri probiotici si dimostra infatti promettente in numerosi impieghi terapeutici, sia nell'adulto, sia in particolari condizioni di vulnerabilità, come nell'anziano e nel bambino. Nell'adulto i probiotici vengono utilizzati nel trattamento di alcune malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD, *inflammatory bowel diseases*), caratterizzate da drastiche alterazioni del microbiota intestinale; nel trattamento della sindrome dell'intestino irritabile (IBS, *irritable bowel syndrome*), uno dei più frequenti disordini della funzionalità intestinale, e nel trattamento di varie forme di malattie diarroiche: da rotavirus, associata ad antibiotici, associata a *Clostridium difficile* e del viaggiatore (Gill & Prasad, 2008). Recenti studi compiuti nel nostro laboratorio su un modello animale di topi colitici, trattati con una miscela di probiotici contenente *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*, hanno dimostrato che tale miscela era molto efficace nel ridurre i sintomi della colite e dell'infiammazione ad essa associata, inducendo un aumento a livello intestinale delle cellule T regolatorie (Treg), una sottoclasse dei linfociti T fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria (Roselli *et al.*, 2009).

**PREVENZIONE DELLE ALLERGIE NEI BAMBINI** - Nei bambini il principale uso dei batteri probiotici è per l'attenuazione delle allergie. Ultimamente, nei paesi industrializzati, si sta assistendo ad un aumento delle malattie di origine allergica. Le evidenze sperimentali suggeriscono un coinvolgimento del microbiota intestinale in alcune delle più comuni malattie allergiche, quali ad esempio la dermatite atopica. È stato dimostrato che i sintomi della dermatite atopica vengono ridotti nei bambini trattati con *L. rhamnosus* GG e lo sviluppo di patologie atopiche risulta minore nei neonati di madri che assumono lo stesso probiotico durante la gravidanza e l'allattamento (Kalliomaki *et al.*, 2003).

**EFFETTI BENEFICI NELL'ANZIANO** - I dismicrobismi prima descritti, che si ritrovano nell'anziano, hanno anche un impatto importante sul sistema immunitario, determinando spesso uno stato infiammatorio cronico, di basso grado, caratteristico degli anziani. Inoltre, tali alterazioni determinano un aumento della suscettibilità all'infezione da parte di batteri enteropatogeni e portano ad una ridotta funzionalità del sistema immunitario, da cui il termine di "immunosenescenza", caratterizzata essenzialmente da riduzione del numero totale di linfociti T e della loro capacità proliferativa, riduzione dei linfociti B, con conseguente minor abilità a produrre anticorpi, riduzione dell'attività citotossica delle cellule natural killer (NK) e ridotta funzionalità delle Treg (Sansoni *et al.*, 2008). Sono stati osservati effetti benefici da parte di *Bifidobacterium lactis* HN019 nel migliorare la risposta immunitaria nell'anziano, a livello di attivazione linfocitaria, attività fagocitica dei macrofagi e attività delle NK (Chiang *et al.*, 2000). Lo stesso ceppo è stato anche utilizzato in *trials* d'intervento di sei settimane in un altro studio, mostrando i medesimi effetti positivi (Arunachalam *et al.*, 2000). In altri studi sono stati utilizzati *Lactobacillus rhamnosus* HN001 o *Bifidobacterium lactis* HN019 per tre settimane (Sheih *et al.*, 2001). Uno studio effettuato su anziani affetti da infezioni gastroenteriche e respiratorie che assumevano latte fermentato con *L. casei* DN-114001 ha mostrato una riduzione nella durata di tali patologie (Turchet *et al.*, 2003).

**PROBIOTICI E OBESITÀ** - Resta ancora molto da capire sulle numerose attività benefiche esercitate dai probiotici e i meccanismi attraverso cui esplicano le loro azioni. Studi molto recenti suggeriscono un ruolo nuovo dei probiotici nell'ostacolare l'obesità. Il drastico incremento del fenomeno dell'obesità che si sta verificando nel mondo occidentale ha stimolato la comunità scientifica a studiare possibili fattori ambientali e individuali alla base di tale scompenso metabolico. Studi portati a termine su individui obesi hanno consentito di associare all'obesità variazioni sostanziali nell'abbondanza relativa delle due divisioni dominanti del microbiota intestinale, *Firmicutes* (*Bacilli*, *Lactobacilli* e *Clostridia*) e *Bacteroidetes*. Il microbiota degli individui obesi è caratterizzato da un incremento in *Firmicutes* e una riduzione in *Bacteroidetes*. A conferma della significatività di tali osservazioni, è stato dimostrato che un microbiota arricchito di microorganismi appartenenti ai *Firmicutes* ha una maggiore capacità di recupero di calorie dalla dieta rispetto a quello di individui sani. Lo stesso probiotico utilizzato negli studi sui bambini allergici, l'LGG, è stato utilizzato anche su bambini potenzialmente obesi, in cui è stato osservato un contenimento dell'acquisto di peso eccessivo durante i primi anni di vita (Luoto *et al.*, 2010). Il probiotico *Lactobacillus gasseri* SBT2055 è stato utilizzato in uno studio compiuto su soggetti obesi, nei quali si è osservata una riduzione dell'adiposità addominale, del peso corporeo e della percentuale di grasso corporeo (Kadooka *et al.*, 2010).

## Bibliografia

- Arunachalam K., Gill H.S. 2000. Chandra R.K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54: 263-267.
- Chiang B.L., Sheih Y.H., Wang L.H., Liao C.K., Gill H.S. 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr* 54: 849-855.
- Food and Agriculture Organization and World Health Organization Expert Consultation. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: Cordoba, Argentina. Available from: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf)
- Gibson G.R., Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Gill H., Prasad J. 2008. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv Exp Med Biol*. 606: 423-454.

- Hebuterne X. 2003. Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Opin Clin Nutr Metabol Care* 6: 49-54.
- Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M., Tsuchida T. 2010. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 64: 636-643.
- Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869-1871.
- Luoto R., Kalliomäki M., Laitinen K., Isolauri E. 2010. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *Int J Obes Epub ahead of print*.
- O'Hara A.M., Shanahan F. 2007. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *Scientific World J* 7: 31-46.
- Roselli M., Finamore A., Britti M.S., Mengheri E. 2006. The probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect the intestinal Caco-2 cells from inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr* 95: 1177-1184.
- Roselli M., Finamore A., Britti M.S., Konstantinov S.R., Smidt H., de Vos WM, Mengheri E. 2007. The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr* 137: 2709-2716.
- Roselli M., Finamore A., Nuccitelli S., Carnevali P., Brigidi P., Vitali B., Nobili F., Rami R., Garaguso I., Mengheri E. 2009. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of  $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bow Dis* 15: 1526-1536.
- Sanson P., Vescovili R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D., Franceschi C., Passeri M. 2008. The immune system in extreme longevity. *Experim Gerontol* 43: 61-65.
- Sheih Y.H., Chiang B.L., Wang L.H., Liao C.K., Gill H.S. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 20: 149-156.
- Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S., Antoine J.M. 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomized, controlled pilot study. *J Nutr Health & Aging* 7: 75-77.
- Woodmansey E.J., McMurdo M.E., Macfarlane G.T., Macfarlane S. 2004. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microfloras in young adults and in non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 70: 6113-6122.

# I probiotici per la valorizzazione dei prodotti caseari tradizionali



**M.C. VERDENELLI**

Scuola di Bioscienze e Biotecnologie, Università di Camerino

La dieta è uno dei principali fulcri nelle strategie sulla salute pubblica messe in atto per mantenere uno stile di vita sano, prevenire malattie croniche quali malattie cardiovascolari, cancro, osteoporosi e anche per assicurarsi una vecchiaia in salute. La crescente domanda di alimenti salutistici sta stimolando l'innovazione e lo sviluppo di nuovi prodotti nell'industria alimentare. Il ruolo degli alimenti funzionali è proprio quello di favorire la salute umana. Gli alimenti funzionali, a metà strada tra alimenti, che forniscono le funzioni fisiologiche di base e i farmaci che curano le malattie, sono utilizzati per mantenere un buono stato di salute e controbilanciare piccoli disordini fisiologici che possono presentarsi in individui sani. Oltre a componenti funzionali già ben riconosciuti, quali le vitamine, i minerali e i micronutrienti, i probiotici appartengono alla nuova generazione di ingredienti attivi che includono, tra gli altri, anche i prebiotici.

I probiotici sono definiti come microrganismi vivi che, se consumati in quantità adeguata, conferiscono dei benefici alla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2001).

I principali ceppi batterici studiati come probiotici appartengono ai batteri acido lattici (LAB) ed in particolare a due generi batterici, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Diverse specie di lattobacilli sono abitanti normali e non patogeni dell'intestino umano ed animale e la loro presenza è molto importante per il mantenimento dell'ecosistema microbico intestinale.

Ci sono evidenze scientifiche crescenti che supportano il concetto che il mantenimento di una microflora intestinale sana può fornire protezione contro disordini gastrointestinali incluse infezioni, malattie infiammatorie intestinali, e perfino il cancro (Oelschlaeger, 2010). L'utilizzo di colture batteriche probiotiche stimola la crescita di microrganismi preferenziali, rimpiazza batteri potenzialmente pericolosi e rinforza i normali meccanismi di difesa del corpo. Oggigiorno esistono numerose evidenze sugli effetti positivi dei probiotici sulla salute umana. Questo però è stato solitamente dimostrato in popolazioni con particolari malattie (Salminen *et al.*, 1998). C'è quindi un urgente bisogno di dimostrare i benefici dei probiotici anche nella popolazione media, generalmente sana. Prima che un probiotico possa essere utilizzato per favorire la salute umana deve soddisfare diversi criteri: deve possedere delle buone proprietà tecnologiche in modo da poter essere prodotto ed incorporato in alimenti senza perdere la vitalità e la funzionalità o creare odori o consistenze sgradevoli; deve sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale e arrivare vivo al suo sito di azione; deve essere capace di funzionare nell'ambiente intestinale. Per studiare i ceppi probiotici nel tratto gastrointestinale, devono essere adottate tecniche molecolari capaci di distinguere i ceppi probiotici assunti con la dieta, dalle migliaia di altri ceppi batterici che colonizzano l'ecosistema gastrointestinale. Inoltre è anche necessaria l'applicazione di metodologie in grado di valutare l'effetto dei ceppi probiotici su altri componenti del microbiota intestinale e soprattutto nell'ospite. Questa valutazione comprende non solo la rilevazione dei benefici sulla salute, ma anche dimostrare che i ceppi probiotici non hanno effetti dannosi. Una volta acquisite queste informazioni, i probiotici vengono saggiati in studi sull'uomo allo scopo di valutarne gli effetti benefici che costituiranno la base per la richiesta di claims salutistici (Mattila-Sandholm and Salminen, 1998).

Alla luce delle evidenze scientifiche degli effetti positivi dei probiotici sulla salute umana, è cresciuto l'interesse verso questi microrganismi, non solo all'interno della comunità scientifica, ma anche tra i consumatori e l'industria alimentare. Il principale segmento nel mercato dei probiotici è rappresentato dai prodotti lattiero-caseari, in particolare dallo yogurt. Questi alimenti sono infatti adatti a promuovere l'immagine salutistica del probiotico essendo essi stessi considerati salutari dalla maggior parte della popolazione. Da un punto di vista tecnologico, inoltre, il processo produttivo dello yogurt può essere facilmente adattato a garantire la sopravvivenza dei batteri probiotici. Si stanno attualmente studiando altri possibili alimenti caseari "carrier" quali gelati o diverse varietà di formaggi. Recentemente si sta tra l'altro assistendo ad una sempre crescente domanda per prodotti probiotici non lattiero-caseari.

La crescente richiesta da parte del mercato di prodotti probiotici funzionali con caratteristiche sempre migliori fa sì che la ricerca nel campo dei probiotici sia sempre più importante e indirizzata all'isolamento di nuovi ceppi batterici con caratteristiche probiotiche migliori rispetto a quelli già presenti in commercio.

I criteri per la selezione dei ceppi batterici probiotici sono stati elencati da diversi autori e comprendono l'origine umana, la non patogenicità, la capacità di sopravvivere al transito gastro-intestinale, l'abilità di aderire alla mucosa intestinale e di colonizzare l'intestino, l'attività antipatogena, la resistenza ad alcuni antibiotici e la presenza di attività metaboliche con effetti benefici sulla salute dell'ospite.

Le caratteristiche ascrivibili ad un ceppo batterico probiotico sono ceppo specifiche ed è quindi importante che ogni ceppo venga analizzato per ogni singola proprietà.

I nostri laboratori sono costantemente impegnati in ricerche sull'isolamento e la caratterizzazione di nuovi ceppi batterici con caratteristiche probiotiche in grado di essere applicati in diverse tipologie di prodotti alimentari e di conferire degli effetti benefici a chi li consuma. In particolare, il recente screening condotto su ceppi batterici di lattobacilli isolati da campioni fecali di volontari anziani, ha portato alla selezione di due ceppi batterici, *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® e *Lactobacillus paracasei* IMC 502®, con ottime caratteristiche probiotiche (Verdenelli *et al.*, 2009). I due ceppi presentano resistenza al transito gastrointestinale, attività antipatogena, elevata capacità di adesione alla mucosa intestinale maggiore rispetto a ceppi batterici della stessa specie attualmente presenti in commercio, ed in più, con la caratteristica di manifestare una più elevata percentuale di adesione se utilizzati in miscela. I due ceppi sono stati brevettati ed utilizzati, sia singolarmente, che in combinazione, per la preparazione di diversi alimenti funzionali che sono poi stati somministrati per le prove "in vivo", indispensabili per poter confermare la sopravvivenza dei ceppi al transito intestinale e l'effettiva adesione, colonizzazione e persistenza degli stessi. Lo studio è stato condotto, per un periodo di 3 mesi, su volontari sani, di entrambi i sessi e di età compresa tra i 24 e i 65 anni. La ricerca dei ceppi batterici probiotici, *L. rhamnosus* IMC 501® e *L. paracasei* IMC 502®, è stata condotta utilizzando tecniche di tipizzazione molecolare, in particolare la RAPD, che consentono di distinguere i ceppi probiotici somministrati da quelli normalmente presenti nell'intestino umano. I risultati di questo studio hanno evidenziato come i due ceppi batterici probiotici, somministrati attraverso gli ali-



menti, siano presenti nei volontari durante il trattamento dietetico e, cosa di primaria importanza, permangano anche dopo 2 settimane dalla fine del trattamento dietetico (Verdenelli *et al.*, 2010). Ai volontari dello studio è stato anche sottoposto un questionario validato per la valutazione della funzionalità intestinale dopo intervento dietetico con i prodotti allestiti con i probiotici selezionati. I risultati del questionario hanno evidenziato come il consumo degli alimenti probiotici abbia favorito la funzionalità intestinale nei soggetti sani, migliorando in maniera significativa il transito intestinale ed aumentando il volume fecale, parametri questi che caratterizzano appunto un'ottima funzionalità intestinale (Slavin and Marlett, 1980; Vuksan *et al.*, 2008).

Ulteriori studi sono stati condotti sui due ceppi batterici probiotici brevettati per dimostrarne l'eventuale capacità antigenotossica, prerogativa che incrementa le già note proprietà funzionali dei probiotici (Verdenelli *et al.*, 2010a). Dallo studio è emerso come i due ceppi probiotici abbiano la capacità di inibire composti con attività mutagena e promutagena. Tali caratteristiche depongono favorevolmente circa un possibile impiego di ceppi probiotici con attività antigenotossica come principi attivi da utilizzare in alimenti funzionali in grado di esercitare un ruolo protettivo nei confronti del rischio genotossico e mutageno a livello intestinale.

Uno studio recentemente conclusosi nei nostri laboratori ha inoltre evidenziato le capacità antiossidanti dei due ceppi batterici probiotici *L. rhamnosus* IMC 501® e *L. paracasei* IMC 502® dimostrate sia *in vitro* che *in vivo* su atleti sottoposti ad una intensa attività fisica. Inoltre, ricerche condotte anche sulle caratteristiche tecnologiche, dimostrano come i due ceppi batterici probiotici possano essere aggiunti a diverse tipologie di alimenti caseari tradizionali e ad altre tipologie di alimenti, aumentandone il valore aggiunto. Tale valore aggiunto deve essere ovviamente mantenuto durante la produzione e per tutta l'intera shelf-life del prodotto.

La nostra ricerca è quindi attualmente rivolta a garantire la vitalità dei ceppi probiotici e la loro stabilità attraverso tecnologie di microgranulazione, come strategia di protezione dei batteri da condizioni di stress sia ambientale che di processo produttivo.

## Bibliografia

- FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Cordoba, Argentina.
- Mattila-Sandholm T. and Salminen S. (1998). Up-to-date on probiotics in Europe. *Gastroenterology International* 11:8-16.
- Oelschlaeger T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International journal of Medical Microbiology* 300: 57-62.
- Salminen S., Ouwehand A.C. and Isolauri E. (1998). Clinical application of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 8: 563-572.
- Slavin J.L. and Marlett J.A. (1980). Influence of refined cellulose on bowel function and calcium and magnesium balance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 33: 1932-1939.
- Verdenelli M.C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianesi C., Cecchini C. and Cresci A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European Journal of Nutrition* 48: 355-363.
- Verdenelli M.C., Silvi S., Cecchini C., Orpianesi C. and Cresci A. (2010). Influence of a combination of two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® and *Lactobacillus paracasei* IMC 502® on intestinal functions on healthy adults. *Letters in Applied Microbiology* (In Press).
- Verdenelli M. C., Ricciutelli M., Gigli F., Cenci G., Trotta F., Caldini G., Cresci A. and Orpianesi C. (2010a). Investigation on antigenotoxic properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® by gas chromatography-mass spectrometry. *Italian Journal of Food Sciences* 4(22)
- Vuksan V., Jenkins A.L., Rogovik A.L., Sievenpiper J.L. and Jovanovski E. (2008). Using cereal to increase dietary fiber intake to the recommended level and the effect of fiber on bowel function in healthy persons consuming North American diets. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (5): 1256-1262.

# **Comunicazioni scientifiche**

# Risposta immunitaria e dieta integrata con lino estruso in ovini da latte nel periparto



G. ACUTI<sup>1</sup>, M. PELA<sup>2</sup>, A. ANTOLINI<sup>2</sup>, M. CAGIOLA<sup>2</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>1</sup>, L. MUGHETTI<sup>1</sup>, L. MOSCATI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

**Parole chiave:** risposta immunitaria, stato ossidativo, lino estruso, ovini da latte.

**INTRODUZIONE** - Gli effetti derivanti dall'utilizzazione di lino (*Linum usitatissimum* L.) nell'alimentazione degli animali da reddito sono stati oggetto di numerose sperimentazioni, pervenute talvolta a risultati discordanti (Zhang et al. 2006; Mughetti et al., 2008; Mele et al., 2005). Alcuni autori hanno valutato il suo impiego nella dieta di ovini in gestazione o in lattazione senza riuscire a spiegare la modalità di azione; altri hanno avuto risposte molto positive nel bovino nei riguardi delle funzioni immunitarie (Caroprese et al., 2009; Caroprese et al., 2006; Calder et al., 2001; De Pablo e De Cienfuegos, 2000). Questa sperimentazione ha avuto come obiettivo la valutazione dell'effetto degli acidi grassi polinsaturi nei riguardi dell'immunità aspecifica e della risposta anticorpale nei riguardi di *Salmonella abortus ovis*.

**MATERIALI E METODI** - Per la prova sono state impiegate 58 pecore di razza sarda suddivise in 2 gruppi omogenei (controllo, CTR e trattato, LIN). In ogni gruppo erano presenti pecore al periparto nonché pecore in asciutta non gravide. Tutti gli animali sono stati alimentati con fieno di II taglio di erba medica; il gruppo LIN riceveva un mangime, isoenergetico ed isoproteico a quello del gruppo CTR ma contenente semi integrali di lino estruso quale fonte di acidi grassi omega-3.

Sono state eseguite le seguenti prove di immunità aspecifica: titolazione del lisozima sierico (Osserman e Lawlor, 1966), determinazione della battericidia sierica (Dorn et al., 1980), titolazione semiquantitativa del complemento sierico (Barta e Barta, 1993) e dello stato ossidativo (metaboliti reattivi all'Ossigeno, ROM's e potere antiossidante del siero, PAO). Per queste determinazioni sono stati effettuati dei prelievi ematici dalla vena giugulare tramite provetta priva di anticoagulante, in particolare 21 e 14 giorni prima del parto. Gli stessi parametri sono stati presi in considerazione anche nel periodo pre-parto nonché 3 giorni e 14 giorni dopo il parto; è stato effettuato un ulteriore prelievo ematico 90 giorni dopo il parto (*follow up*).

Tutte le pecore sono state vaccinate trentacinque giorni prima del parto per *Salmonella abortus ovis* con un vaccino spento stabulogeno (fornito dall'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Perugia); il richiamo è stato effettuato dopo 14 giorni. Il titolo anticorpale è stato valutato 28, 21, 14 e 7 giorni prima del parto mediante siero agglutinazione lenta.

I dati sono stati analizzati mediante procedura GLM del software SAS (2001) utilizzando un modello per misurazioni ripetute.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I parametri di immunità naturale umorale non mostrano particolari differenze (Tabella 1) dovute al tipo di dieta. Nel caso del complemento libero è stata evidenziata un'interazione significativa ( $P=0.005$ ) tra dieta e tempo di prelievo. Si può notare anche una tendenza alla diminuzione del PAO e un parallelo aumento dei ROM's nei giorni immediatamente successivi al parto.

Per quanto riguarda i dati riportati nella Tabella 2 si può notare, come atteso, una diminuzione nel tempo della concentrazione di anticorpi nel siero in entrambi i gruppi. È però interessante evidenziare che il gruppo trattato con il lino presenta, a 7 giorni dal parto, un titolo anticorpale nei confronti di *Salmonella abortus ovis* maggiore del gruppo controllo ( $P=0.044$ ).

Analizzando i risultati ottenuti, si può concludere che la dieta non abbia avuto nel complesso una forte influenza sui parametri legati all'immunità naturale. L'effetto positivo nei confronti del titolo anticorpale riscontrato in questa ricerca necessita di ulteriori approfondimenti sperimentali.

**Tabella 1** - Andamento di alcuni parametri relativi all'immunità aspecifica in dipendenza dal tempo (giorni rispetto al parto) e dalla dieta (medie stimate±ES).

		-21	-14	-7	+3	+14	+90	ES
Batt	L	90.34	58.76	59.02	82.57	78.51	75.52	6.37
	C	94.65	64.71	62.25	83.62	79.61	94.03	
Liso	L	0.52	2.69	2.13	1.91	1.40	1.45	0.13
	C	0.43	2.29	1.78	1.55	1.41	1.47	
Compl	L	42.90A	48.23AB	53.20AB	61.97B	41.07A	42.77A	2.72
	C	39.96A	43.43AB	48.29AB	53.01AB	52.92AB	39.69A	
ROM's	L	3.97	4.78	4.80	5.37	3.63	3.19	0.12
	C	3.84	4.40	4.59	4.82	3.77	3.07	
PAO	L	255.12	251.02	223.00	158.69	244.99	242.96	6.16
	C	241.40	240.15	219.59	154.85	241.96	251.14	

Dieta: gruppo trattato (Lino, L) e gruppo controllo (C). Batt: battericidia; liso: lisozima; Compl: complemento; ROM's: metaboliti reattivi dell'Ossigeno; PAO: potere antiossidante del siero. Lettere diverse indicano differenze ( $P=0.005$ ).

**Tabella 2** - Andamento del titolo anticorpale ( $\log^{10}$ ) nei confronti di *Salmonella abortus ovis* in dipendenza dal tempo (giorni rispetto al parto) e dalla dieta (medie stimate±ES).

		-28	-21	-14	-7	ES
Titolo anticorpale	L	2.75a	2.22bc	2.22bc	2.16b	0.07
	C	2.80a	2.29b	2.30b	2.00c	

Dieta: gruppo trattato (Lino, L) e gruppo controllo (C). Lettere diverse indicano differenze ( $P=0.044$ ).

Sperimentazione effettuata nell'ambito del Progetto di Ricerca "Effetti dello stato fisiologico e di una dieta ricca di acidi grassi polinsaturi (PUFA) sulla funzione immunitaria degli ovini" (IZS UM 11/08 RC, Responsabile Dott.ssa L. Moscati).

## Immune response and extruded linseed diet in transition dairy sheep

**Key words:** immunity response, oxidative status, extruded linseed, dairy sheep.

## Bibliografia

- Zhang R. et al (2006). Small Rumin. Res.; 63, 233-41. Mughetti L. et al. (2008). Large Animal Review; 14, 209.  
 Mele M. et al. (2005). Ital. J. Anim. Sci.; 4, 53-62.  
 Caroprese et al. (2009). J. Dairy Sci. 92, 2796-803.  
 Caroprese et al. (2006). J. Dairy Sci. 89:562-8.  
 Calder P.C. (2001). Nutr. Res., 21, 309-41.  
 De Pablo M.A., De Cienfuegos A. (2000). Cell Biology, 78, 31-9.  
 Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966). J. Exp. Med. 124, 921-52.  
 Dorn W. et al. (1980). Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin 34, 635-50.  
 Barta V., Barta O. (1993). In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA. SAS Institute Inc. (2001), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

# Assenza degli alleli protettivi per la scrapie AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub> nelle razze ovine piemontesi



P.L. ACUTIS, S. COLUSSI, M.V. RIINA, T. GIOVANNINI, S. TRISORIO, M.G. MANIACI, F. ZUCCON, S. PELETTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino

**Parole chiave:** ovino, scrapie, polimorfismo, pirosequenziamento.

**INTRODUZIONE** - Il Piemonte è caratterizzato da un patrimonio ovino costituito essenzialmente da razze quali la Frabosana, Sambucana e Delle Langhe, contraddistinte da una modesta consistenza e da razze quali la Biellese, che presenta una maggiore consistenza numerica, ma una frequenza estremamente ridotta dell'allele di resistenza alla scrapie ARR. In questo contesto, il piano di selezione genetica per controllare la scrapie, applicato dalla Regione Piemonte obbligatoriamente su tutte le razze autoctone, risulta complesso, in quanto richiede una progressione lenta e un'attenta gestione dei riproduttori.

Recentemente sono stati segnalati nella razza Sarda due alleli del gene *PRNP* anch'essi associati a resistenza alla scrapie: AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub><sup>1</sup>. La possibilità di utilizzare questi alleli come target addizionali di selezione costituisce una prospettiva interessante proprio in razze come quelle piemontesi, in quanto potrebbe favorire una più rapida progressione del piano di selezione per scrapie, permettendo nel contempo di mantenere una maggiore variabilità genetica. Questo lavoro rappresenta un'indagine genetica sulle razze ovine piemontesi per verificare la presenza di questi due marcatori; viene inoltre descritta la messa a punto di un metodo ad alta resa quale il pirosequenziamento<sup>2</sup> con cui è stata condotta l'analisi.

**MATERIALI E METODI** - Per la messa a punto del metodo è stato utilizzato un campione eterozigote per il codone 137 ed uno eterozigote al codone 176 ripetuti per 10 volte e successivamente inseriti come controllo in ciascuna analisi effettuata; il genotipo di questi due campioni era stato precedentemente determinato mediante sequenziamento diretto secondo il protocollo pubblicato da Bossers *et al.*<sup>3</sup>.

Sono stati analizzati 50 campioni di sangue in EDTA per ciascuna delle specie considerate. I campioni sono stati scelti dalla emoteca del Laboratorio di Genetica e Immunobiologia, costituita da sangue sottoposto a genotipizzazione nell'ambito dei piani di selezione, secondo i seguenti criteri: sesso maschile, non imparentati tra loro e di genotipo ARQ/ARQ relativamente ai tre codoni 136, 154 e 171 (ossia wild-type). L'estrazione del DNA è stata effettuata con il metodo semi-automatico KingFisher96 (Thermo Electron Corporation) utilizzando il kit di estrazione ChargeSwitch Sheep Blood (Invitrogen). Dall'estratto ottenuto sono state allestite due PCR: una per il codone 137 e una per il codone 176, mediante utilizzo di Platinum<sup>®</sup> qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) e di primer specifici (300 nM) riportati in Tabella 1. I primer sono stati disegnati su una porzione dell'ORF del gene *PRNP* utilizzando il software Primer3 disponibile gratuitamente on-line (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Mediante lo stesso software è stato disegnato un primer di sequenza forward (5'-GCTACATGCTGGGAAG-3') per il pirosequenziamento del codone 137 ed un primer di sequenza reverse da utilizzare nel pirosequenziamento del codone 176: (5'-TGTGACACAGTCATGCACAA-3') con siti di annealing alla sequenza ovina di riferimento (GenBank AJ000739) rispettivamente da 460 a 475 e da 624 al 604.

**RISULTATI** - I primer di PCR e di sequenza per i codoni d'interesse si sono rivelati idonei allo scopo e in grado di individuare le mutazioni in esame, 137 M/T (*atg>acg*) e 176 N/K (*aac>aaa*), presenti nei controlli. In nessuno dei campioni analizzati sono state riscontrate mutazioni relative ai due codoni di interesse.

**Tabella 1** - Primer di PCR.

Primer di PCR per il codone 137	Siti di annealing alla sequenza ovina di riferimento (GenBank AJ000739)
137 F (5'-CAGTAAGCCAAAAACCAACA-3')	386-405
137 R biotinilato (5'-TGCACAAAGTTGTTCTGGTTACTA-3')	610-587
Primer di PCR per il codone 176	
176 F biotinilato in 5' (5'-CAGTAAGCCAAAAACCAACA-3')	386-405
176 R (5'-AGCCTGGGATTCTCTCTGGT-3')	752-733

**CONSIDERAZIONI** - I risultati ottenuti hanno dimostrato la totale assenza negli animali analizzati, in ogni razza, degli alleli di interesse. Tenuto conto della dimensione campionaria, si può stimare, calcolando l'intervallo di confidenza con una probabilità del 95%, che questi alleli potrebbero presentare una frequenza massima pari al 3,6% nelle razze esaminate. Questo dato rende quindi difficilmente proponibile l'utilizzo di tali alleli per favorire l'incremento del piano di selezione della Regione Piemonte. L'esperienza effettuata dimostra che la variabilità del gene *PRNP* deve essere studiata specificamente in ogni razza ovina di interesse, prima di decidere quali azioni intraprendere per controllare la scrapie attraverso la selezione genetica. I risultati preliminari di uno studio da noi effettuato su campioni di archivio sembrano indicare che gli alleli AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub> si presentano con una bassa frequenza anche negli ovini provenienti da altre regioni italiane: se il dato dovesse essere confermato, questi alleli non fornirebbero quindi un contributo sostanziale ai piani di selezione attuali, eccezion fatta per la razza sarda.

**■ Absence of the alleles AT<sub>137</sub>RQ e ARQK<sub>176</sub> protective to scrapie in ovine Piedmontese breeds**

**Key words:** ovine, scrapie, polymorphism, pyrosequencing.

## Bibliografia

- Vaccari G., Scavia G., Sala M., Cosseddu G., Chiappini B., Conte M., Esposito E., Lorenzetti R., Perfetti G., Marconi P., Scholl F., Barbaro K., Bella A., Nonno R., Agrimi U. (2009). *Vet Res*, 40(3):19. Epub 2009 Jan 27.
- Ahmadian A., Ehn M., Hober S. (2006). *Clin Chim Acta*, 363: 83-94.
- Bossers, A., Schreuder, B. E. C., Muileman, I. H., Belt, P. B. & Smits, M. A. (1996). *J Gen Virol*, 77: 2669-2673.

# Isolamento di *Pithomyces chartarum* da ovini con eczema facciale allevati in Italia



F. AGNETTI<sup>1</sup>, M. GARAGUSO<sup>2</sup>, G. PRESTERA<sup>2</sup>, E. MANUALI<sup>1</sup>, M. RODOLFI<sup>3</sup>, E. LEPRI<sup>4</sup>, F. TONUCCI<sup>1</sup>, G. FILIPPINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Pesaro

<sup>2</sup> Associazione Provinciale Allevatori, Potenza

<sup>3</sup> Dip. di Ecologia del Territorio, Sez. di Micologia, Università degli Studi di Pavia

<sup>4</sup> Dip. di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Sez. di Patologia e Igiene Veterinaria, Università di Perugia

**Parole chiave:** *Pithomyces chartarum*, ovini, eczema facciale.

**INTRODUZIONE** - I microfunghi del genere *Pithomyces* sono ascomi- ceti caratterizzati da rapida crescita miceliare *in vitro* e capacità di produrre conidi scuri ellittici, oblungi o piriformi, tipicamente echinulati o verrucosi, settati sia trasversalmente che longitudinalmente<sup>1</sup>; sono di frequente ritrovamento nel suolo, spesso associati a residui organici, detriti, rifiuti<sup>2</sup>. Di particolare interesse è *P. chartarum* (Berk & Curtis) Ellis (anamorfo di *Leptosphaerulina chartarum* Cec. Roux), specie saprofitrofa in grado di colonizzare differenti substrati vegetali e, in particolare, le regioni basali dei cereali, formando numerosissimi conidi ricchi di tossine, che, disseminati da vento e pioggia, rendono tossici i pascoli<sup>3</sup>. Fra i vari metaboliti tossici, *P. chartarum* produce ciclopeptidi, descritti come sporidesmolidi I, II e III, che ne ricoprono i conidi in forma di minute spicole e che sono i precursori della sporidesmina A<sup>4</sup>. Tale molecola è dotata di notevole potere epatotossico per gli ovini (LD<sub>50</sub> pecora/os: <1 mg/kg). I danni indotti da essa in sede epatica provocano un aumento di bilirubina e di filloeritrina nel sangue: quest'ultimo pigmento, derivante dalla degradazione della clorofilla, ha proprietà fotodinamiche. Pertanto, la presenza di filloeritrina nel sangue induce la comparsa di manifestazioni di fotosensibilizzazione, soprattutto a carico delle regioni glabre, come ad es. il muso (eczema facciale), più esposte alla luce solare<sup>5</sup>. L'eczema facciale è una malattia tipicamente diffusa tra gli ovini allevati al pascolo in Nuova Zelanda ed Australia<sup>(4)</sup>, ma i recenti cambiamenti climatici, assieme alla globalizzazione dei mercati sia di bestiame che di derrate alimentari ad esso destinate, possono consentire la comparsa di tale patologia anche alle nostre latitudini. Nel presente contributo viene descritto un episodio di eczema facciale verificatosi in un gregge allevato al pascolo in provincia di Potenza ed il successivo reperimento di isolati di *P. chartarum* nelle feci degli ovini coinvolti.

**MATERIALI E METODI** - All'esame clinico, i soggetti in questione (razza Merinizzata italiana, età media 3 anni) mostravano vaste zone di dermatite pruriginosa, di aspetto eczematoso, a livello della regione della testa e del muso, in associazione ad edema della regione orbitale. Al momento della comparsa delle lesioni (stagione primaverile) il gregge era allevato al pascolo semibrado. Campioni di feci degli animali con lesioni sono stati raccolti e sottoposti ad indagini micologiche (semina, per impronta diretta e previa diluizione in soluzione fisiologica, su Sabouraud dextrose agar; incubazione a 24±1°C in aerobiosi; osservazione macro- e microscopica dei miceli). Su un soggetto in condizioni terminali ed appositamente sacrificato, è stato effettuato l'esame autotopico, durante il quale, oltre alle alterazioni a carico della cute della regione della testa, si sono riscontrate anomalie macroscopiche in sede epatica; campioni di fegato sono stati quindi sottoposti a prelievo per esame istologico.

**RISULTATI** - L'esame colturale micologico, oltre ad evidenziare lo sviluppo di varie colonie fungine sia filamentose che lieviformi, ha permesso l'individuazione, da tutti i campioni, di colonie a rapida crescita

(9 cm in 8 gg a 24°C), con tessitura cotonosa, di colore virante dal bianco iniziale al grigio-marrone post-sporificazione. L'esame microscopico delle stesse ha mostrato presenza di ife settate, con conidiofori corti e conidi singoli, multicellulari, di forma ovoidale o ellittica (18-29 x 10-17 µm), più o meno intensamente pigmentati, rugosi in superficie, generalmente costretti a livello dei setti trasversali. Le caratteristiche macro- e microscopiche delle colonie coltivate *in vitro* hanno permesso di definirle come appartenenti alla specie *P. chartarum*. All'esame autotopico del soggetto esaminato, la cute della regione della testa presentava vari gradi di eritema, edema, emorragie e necrosi epidermica multifocale; la cornea appariva edematosa; il fegato si mostrava moderatamente ingrossato con superficie irregolare, di colore bruno pallido e con screziature biancastre. Istologicamente, il quadro epatico evidenziava invece una grave fibrosi periportale a ponte, con proliferazione duttile biliare e marcato infiltrato linfoplasmacellulare e istiocitario; gli epatociti mostravano un modesto rigonfiamento e lieve anisocitosi, con presenza di cellule modicamente cariomegaliche e rare cellule binucleate. Le lesioni erano riferibili a grave epatite cronica sclerosante (fibrosi epatica) con proliferazione biliare.

**CONSIDERAZIONI** - Scarsi sono i dati pubblicati a livello europeo in tema di eczema facciale dei ruminanti; soltanto van Wuijckhuise *et al.* (2006)<sup>5</sup> descrivono il primo caso di tale patologia in bovini olandesi. I risultati ottenuti dalla presente indagine contribuiscono a riconoscere la presenza di *P. chartarum* anche in Italia, ribadendo come tale microfungo sia il principale responsabile di eczema facciale negli ovini, nonché produttore di molecole epatotossiche. Ulteriori indagini, anche su matrici vegetali autoctone, saranno necessarie per rilevare la presenza del micete in contesti zootecnici e geografici diversi del nostro Paese.

## ■ Isolation of *Pithomyces chartarum* from sheep with facial eczema reared in Italy

**Key words:** *Pithomyces chartarum*, sheep, facial eczema.

## Bibliografia

1. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press, London, UK: pag. 657-659.
2. Andreoni S., Farina G., Lombardi G. (2003). Atlante di Micologia Medica. Grafik@rt srl: pag. 200.
3. Cabras P., Martelli A. (2004). Chimica degli Alimenti. Ed. Piccin: pag. 683-684.
4. Nicoletti R., De Stefano S. (2000). Peptidi ciclici di origine fungina. Ne "Il Tabacco", 3: pag. 44.
5. van Wuijckhuise L., Snoep J., Cremers G., Duvivier A., Groeneveld A., Ottens W., van der Sar S. (2006). First case of pithomycotoxicosis (facial eczema) in the Netherlands. Tijdschr Diergeneeskd, 1; 131(23): pag. 858-861.



# Valutazione preliminare dell'infestazione da nematodi gastrointestinali in due razze caprine allevate in Lombardia



E.G. ALBERTI<sup>1</sup>, I.L. ARCHETTI<sup>2</sup>, M.T. MANFREDI<sup>1</sup>, S. ZANZANI<sup>1</sup>,  
G. BRUNI<sup>3</sup>, G. ZANATTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia

<sup>3</sup> Associazione Regionale Allevatori Lombardi (ARAL, Crema)

**Parole chiave:** parassiti, nematodi gastrointestinali, capra, razza.

**INTRODUZIONE** - Le parassitosi da nematodi gastrointestinali sono una fonte di notevoli perdite economiche nell'allevamento della capra da latte che, a differenza della pecora, non sviluppa un'efficace immunità verso i parassiti, anzi le infestazioni ripetute ne compromettono lo stato fisiologico e le produzioni in misura importante (Hoste e Chartier, 1998). Ciò nonostante, tra i vari studi nella ricerca di metodi alternativi per il controllo delle parassitosi, sembra incoraggiante il fatto che esista una resistenza alle infestazioni a livello genetico sia in alcune linee parentali all'interno di una stessa razza (Pralomkarn et al., 1997) sia in alcune razze piuttosto che in altre (Baker et al., 1998). Lo scopo dello studio è stato quello di confrontare la risposta di 2 razze caprine, Camosciata delle Alpi e Nera di Verzasca (autoctona), all'infestazione da nematodi gastrointestinali.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata svolta su un gregge di capre da latte allevate in modo semi-intensivo in Val Veddasca (VA) con sfruttamento del pascolo per gran parte dell'anno; il gregge è costituito da capi di razza Camosciata delle Alpi e Nera di Verzasca mantenuti nelle medesime condizioni. Gli animali sono stati trattati con albendazolo al dosaggio per la capra nel mese di novembre 2009 ed i campioni fecali sono stati prelevati a partire da gennaio 2010. Sono stati esaminati 60 soggetti in lattazione (30 capi di razza Camosciata delle Alpi e 30 capi di razza Nera di Verzasca) appartenenti a gruppi di lattazione diversi (1. capre in 1<sup>a</sup> lattazione; 2. soggetti in 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> lattazione; 3. soggetti oltre la 3<sup>a</sup> lattazione). Da ogni capo sono stati effettuati prelievi di feci dal retto e di sangue dalla vena giugulare con cadenza mensile da gennaio 2010 ad aprile 2010. La conta delle uova di nematodi gastrointestinali nelle feci (upg) è stata effettuata tramite la FLOTAC *double technique* usando la soluzione di flottazione 2 (NaCl p.s. 1,200) (Cringoli, 2006). Il sangue è stato conservato in EDTA e sono stati determinati i principali parametri emocromocitometrici.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I risultati sono stati accorpati in due bimestri per meglio evidenziare gli effetti stagionale e nutrizionale sui livelli di parassitismo gastrointestinale. I valori di upg riportati in Tabella 1 sono composti quasi esclusivamente da uova di *Strongylida* (compreso *Nematodirus*) e in misura minore di *Strongyloides*. Le medie di infestazione si elevano in tutti i gruppi da 16 a 45 volte (upg ratio 2° bimestre/1° bimestre) in corrispondenza del cambio di stagione che coincide con il maggior sfruttamento del pascolo e mostrano un andamento crescente dal 1° al 3° gruppo sia per la Camosciata sia per la Nera di Verzasca. In partenza i valori di NGI sono bassi in entrambe le razze ed in tutte le classi di età; il notevole aumento dell'infestazione nel 2° bimestre, che

**Tabella 2** - Valori dei parametri emocromocitometrici nelle due razze caprine.

Parametro	Unità di misura	Camosciata		Nera di Verzasca	
		Media	Variazione tra bimestri	Media	Variazione tra bimestri
RBC	10 <sup>6</sup> /μl	13,56	-0,74	14,51	-0,02
HGB	g/dl	9,08	-0,77	9,59	-0,36
HCT	%	27,41	-2,21	28,74	-0,60
MCV	fl	20,32	-0,48	19,86	-0,40
MCH	pg	6,68	-0,20	6,62	-0,23
MCHC	g/dl	33,02	-0,24	33,40	-0,50
RDW	%	33,55	-0,68	35,15	-1,98
WBC	10 <sup>3</sup> /μl	4,54	0,95	2,44	0,42
Neutrofili	10 <sup>3</sup> /μl	5,46	0,88	4,36	0,10
Linfociti	10 <sup>3</sup> /μl	0,25	0,05	0,13	0,00
Monociti	10 <sup>3</sup> /μl	0,08	-0,01	0,49	0,84
Eosinofili	10 <sup>3</sup> /μl	10,83	1,71	7,30	0,52
Basofili	10 <sup>3</sup> /μl	0,52	-0,11	0,29	0,00
Neutrofili	%	42,44	3,08	33,24	3,11
Linfociti	%	49,42	-1,52	59,62	-2,52
Monociti	%	4,94	-1,44	4,13	-0,28
Eosinofili	%	2,39	0,08	2,06	-0,25
Basofili	%	0,78	-0,23	0,94	-0,05

potrebbe essere imputabile anche al peri-parturient rise oltre che ai fattori suddetti, ha però caratteristiche differenti nelle due razze. Va notato infatti che, per quanto ciò avvenga in entrambe le razze, nelle Nere di Verzasca i valori rimangono meno elevati in tutte le categorie produttrici. Per contro dall'emocromocitometrico (Tabella 2) emerge un calo dei globuli rossi, dell'emoglobina e dei parametri ad essi legati ed un aumento dei parametri leucocitari, in particolare nelle popolazioni eosinofila e neutrofila (valore assoluto e percentuale) più marcato nelle Camosciate, per quanto le altre popolazioni risultino rappresentate in maniera costante o in lieve calo (linfociti % e monociti %).

## ■ Preliminary assessment of infection by gastrointestinal nematodes in two goat breeds reared in Lombardy

**Key words:** parasite, gastrointestinal nematodes, goat, breed.

**Tabella 1** - Valori di uova per grammo di feci (upg) nelle due razze caprine.

Razza	Gruppo	upg (media ± d.s.) 1° bimestre	upg (media ± d.s.) 2° bimestre	upg Variazione tra bimestri
Camosciata	1	50,3±69,5	978,6±977,8	+928,3
	2	53,4±64,1	1216,5±947,2	+1163,1
	3	48,1±58,5	1460,4±1660,4	+1412,3
Nera di Verzasca	1	40,2±46,3	669,6±540,4	+629,4
	2	24,9±27,8	799,9±645,7	+775
	3	25,7±22,7	1165,5±789,7	+1139,8

## Bibliografia

- Pralomkarn W., Pandey V.S., Ngampongai W., Choldumrongkul S., Saithano S., Rattanaachon L., Verhulst A. (1997), *Veterinary Parasitology*; 68: 79-90.
- Hoste H. Chartier C. (1998), *Veterinary Parasitology*; 74: 43-54.
- Baker R.L., Mwamachi D.M., Audho J.O., Aduda E.O., Thorpe W. (1998) *Veterinary Parasitology*; 79: 53-64.
- Cringoli G. (2006), *Parassitologia*; 48: 381-384.

# Benessere animale nei caprini: studio di alcuni parametri immunitari nelle fasi di mungitura



L. ALFIERI, A. FAGIOLO, C. RONCORONI, A. DAL PRA', O. LAI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

**Parole chiave:** benessere animale, caprini, parametri immunitari.

**INTRODUZIONE** - L'allevamento caprino è stato indirizzato negli ultimi decenni verso un aumento della produzione del latte introducendo razze specializzate non nazionali e con sistemi di allevamento prevalentemente intensivi. Lo stress legato alle alte produzioni può influenzare la sfera del benessere favorendo l'insorgenza di patologie condizionate. A questo proposito, lo studio dei parametri immunitari rappresenta uno strumento fondamentale nella valutazione degli indicatori di benessere nelle specie di interesse zootecnico. Nell'ambito di un più ampio progetto di valutazione del benessere nella specie caprina, abbiamo analizzato alcuni parametri della risposta immunitaria, di tipo aspecifico e di tipo specifico. In particolare, sono state valutate le fasi di entrata in mungitura, ritenuta critica e pertanto stressante dal punto di vista fisiologico e del benessere animale, e alcune fasi della lattazione.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato effettuato in una azienda biologica, di tipo semi-estensivo con accesso al pascolo, che utilizza capre di razza Camosciata iscritte al Libro Genealogico. Sono state selezionate 10 capre primipare, clinicamente sane, omogenee per stadio di lattazione e tipo di parto (singolo). L'alimentazione, basata prevalentemente su pascolo naturale è integrata, al momento della mungitura (2 volte/die), con mangime e fieno di erba medica di produzione aziendale somministrato *ad libitum* nei ricoveri. I prelievi individuali di sangue sono stati effettuati ad inizio mungitura (marzo), dopo 3 settimane (aprile), dopo 3 mesi (giugno) e a fine lattazione (settembre). I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare e conservati a 4°C in provette con EDTA fino all'arrivo in laboratorio. Per l'esecuzione delle indagini immunitarie aspecifiche (lisozima e battericidia) è stato utilizzato un metodo microbiologico mentre, per i parametri immunitari specifici, i campioni sono stati processati con il citometro a flusso (Becton & Dickinson) con l'impiego di anticorpi CD4 (VMRD 17D1) e CD8 (VMRD CACT80C). Inoltre, su tutti i campioni, è stato eseguito l'esame emocromocitometrico (Cell-Dyn 3700), la formula leucocitaria su striscio e la determinazione delle gammaglobuline con metodo elettroforetico.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nel corso degli anni sono già stati eseguiti numerosi studi sui parametri immunitari della specie bovina e caprina<sup>1,2,3,4</sup>.

Nel nostro studio, per quanto riguarda i parametri aspecifici della risposta immunitaria, i prelievi al momento dell'entrata in mungitura (1 prelievo), e i successivi (2, 3 e 4) risultano caratterizzati da un valore stabile dei leucociti compreso nei range fisiologici della specie ( $4 \cdot 12 \times 10^3$ ). L'andamento dei linfociti tra il primo prelievo (separazione dai capretti ed entrata in mungitura) e il terzo ha evidenziato una diminuzione relativa progressiva (range fisiologico 10-50%), correlata ad un aumento dei neutrofili (range 37-80%) evidente nel terzo prelievo, dovuto ad un corrispondente aumento del valore del cortisolo. Come già osservato nel bovino<sup>5</sup>, la determinazione del lisozima (range 1-3 mg/ml) indica un valore elevato all'entrata in mungitura, mentre si verifica una notevole diminuzione negli ultimi due prelievi a fine lattazione. Ciò potrebbe essere riferibile ad uno stato flogistico-reattivo dovuto allo stress psico-fisico della fase di "entrata in mungitura" e separazione dal capretto, particolarmente rilevante nei soggetti primipari. L'andamento dell'attività battericida (range > 90%) sottolinea, dopo tre mesi dall'entrata in mungitura (terzo prelievo), un tentativo di ripristi-

**Tabella 1**

P	lisoz.	batt.	wbc	neu	linfoc	CD4	CD8	γ Glob.	cort.
1	6,2 a	53 b	10	48 ab	45 ab	33 b	13	1,47 b	1.3 b
2	4,91 b	31 c	11	44 ab	40 ab	35 ab	13	1,73 b	2.4 b
3	0,41 c	76 a	11	55 a	37 b	37 a	14	1,81 ab	5.5 a
4	0,46 c	47 b	11	40 b	51 a	35 ab	16	2,18 a	1.6 b

Legenda: lettere diverse indicano differenze significative - ( $P < 0.05$ )

nare valori fisiologici coincidente con il cambiamento di gestione degli animali (uscita al pascolo estivo). Infine, l'andamento delle gammaglobuline (mg/dl) evidenzia un progressivo aumento dal primo all'ultimo prelievo. Le sottopopolazioni linfocitarie, considerate parametri immunitari specifici, analizzate con il citometro a flusso, indicano nell'andamento dei CD4 (%) un lieve aumento fino al terzo prelievo e una diminuzione nella fase di fine lattazione (ultimo prelievo). Ciò potrebbe essere dovuto alla risposta adattativa allo stress dell'entrata in mungitura, mentre nell'ultima fase di lattazione si ripristina un certo grado di omeostasi immunitaria.

La percentuale dei CD8 (%) registra un graduale aumento tra il primo e l'ultimo prelievo. Le percentuali di CD4 e CD8 osservate nello studio sono in accordo con i valori fisiologici attribuiti a questa specie.

## ■ Animal welfare in the goat: study of the immune response during milking

**Key words:** animal welfare, goat, immune parameters.

## Bibliografia

1. Navarro J.A., Caro M.R., Seva J., Rosillo M.C., Gomez M.A., Gallego M.C. (1996). Study of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and secondary lymphoid organs in the goat using monoclonal antibodies to surface markers of bovine lymphocytes. *Vet. Immun. Immunopathology* 51 pag 147-156.
2. Winnicka A., Klucinski W., Hoser G., Sikora J., Kawiak J. (1999) Flow cytometry analysis of milk and peripheral blood cells from goats during lactation. *J. Vet. Med. A* 46 pag. 459-464.
3. Meglia G.E., Johannisson A., Agenes S., Holtenius K., Persson Waller K. (2005). Effects of feeding intensity during dry period on leucocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows. *The Veterinary Journal* 169; 376-384.
4. Amadori M. e Archetti I.L. (2002) La valutazione del benessere nella specie bovina. Fondazione Iniziative zooprofilattiche e zootecniche-Brescia.
5. Bonizzi L., Amadori M., Melegari M., Ponti W., Ceccarelli A., Bolzani E. 1989. Characterization of some parameters of non-specific immunity in dairy cattle. *J.Vet. Med. B36*, 365-373.
6. Ponti W., Amadori M., Agnoletti F., Bonizzi L., Peri E., Caldora C. 1989. Characterization of some parameters of non-specific immunity in beef cattle. *J.Vet. Med. B36*, 402-408.

# Differenza nell'epidemiologia della scrapie atipica e classica in Italia



M.C. BONA, C. MAURELLA, G. RU

BEAR - Biostatistica, Epidemiologia e Analisi del Rischio - IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

**Parole chiave:** TSE, epidemiologia scrapie atipica, scrapie classica.

**INTRODUZIONE** - Con l'affinamento delle indagini di caratterizzazione dei ceppi di TSE circolanti, sono comparse in tutta Europa segnalazioni di casi di scrapie definiti atipici, caratterizzati da una diversa distribuzione dell'infettività nei tessuti nervosi, dal coinvolgimento di genotipi semi-resistenti/resistenti nei confronti della forma classica della malattia e da differenti caratteristiche epidemiologiche. Nell'ambito della sorveglianza attiva, nel settembre 2004, anche in Italia, è stato utilizzato un nuovo test rapido, in grado di individuare le forme atipiche e a maggio 2005 è stato identificato il primo caso.

Scopo del lavoro è la descrizione della forma atipica di scrapie (AS) in Italia, confrontata con la forma classica (CS), nel periodo 2005-2008, utilizzando gli strumenti dell'epidemiologia descrittiva.

**METODI** - I dati raccolti sono stati analizzati con software statistico Stata10. La distribuzione della malattia è stata valutata nel tempo, nello spazio e in base alle caratteristiche degli animali colpiti. Sono stati utilizzati sia dati di incidenza, derivanti dalla combinazione di sorveglianza attiva e passiva, sia dati di prevalenza individuale (casi/10.000 test) derivanti dalla sorveglianza attiva.

**RISULTATI** - Dal 2005 al 2008 sono stati identificati 59 casi di AS negli ovini e 10 nei caprini (Figura 1). La sorveglianza attiva rappresenta la via principale d'individuazione dei casi atipici. Rispetto alla CS i casi atipici sembrano essere concentrati soprattutto nelle regioni centro-meridionali del paese. In entrambe le specie, ovina e caprina, la CS mostra tassi di prevalenza più alta tra gli animali morti (18,2 IC 95% 15,0-21,9) rispetto a quelli regolarmente macellati (4,8 IC 95% 3,9-5,7) in contrasto con la AS per la quale si rileva una prevalenza simile in entrambi i flussi di sorveglianza (morti 3,5 IC 95% 2,0-5,7; reg macellati 3,4 IC 95% 2,5-4,6). Gli animali colpiti da AS sono tendenzialmente più vecchi di quelli colpiti da CS; negli ovini la differenza è statisticamente significativa, mentre nei caprini è al limite della significatività (Figura 2).

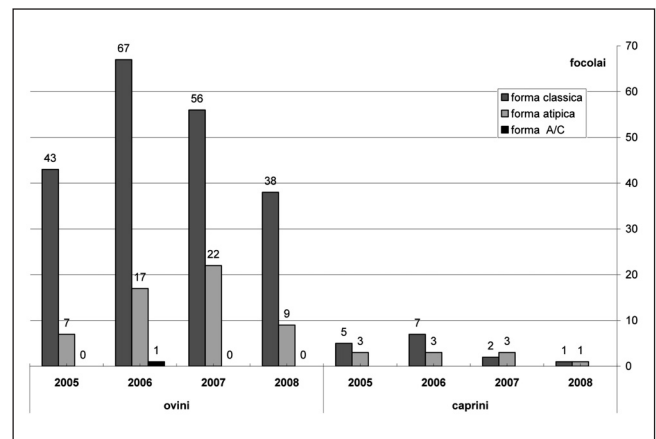
**CONCLUSIONI** - I dati disponibili indicano che la AS in Italia, come nella maggior parte dei paesi europei, è una malattia con prevalenza molto bassa all'interno del gregge. Prevalenze simili nei 2 flussi di sorveglianza fanno supporre una rilevanza trascurabile dell'espressione clinica della malattia e della trasmissione intrallevamento. I dati accumulati suggeriscono che anche nei caprini l'AS colpisca preferibilmente una differente, più anziana, fascia di età rispetto alla CS con potenziali implicazioni per la sorveglianza. La raccolta dei dati epidemiologici è fondamentale ai fini della comprensione della malattia e dell'attuazione di un efficace piano di eradicazione

## ■ Epidemiology's difference of atypical and classical scrapie in Italy

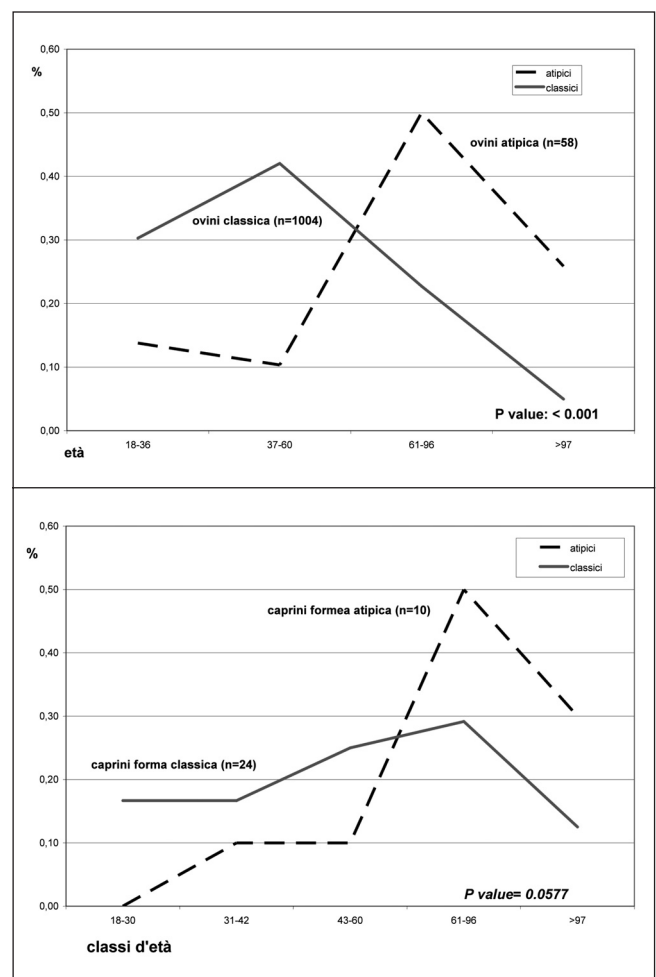
**Key words:** TSE, Epidemiology, Atypical scrapie, Classical scrapie.

## Bibliografia

- Benestad S.L. - Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *The Vet. Rec.*, 2003, 153, 202-208.
- European Food Safety Authority - Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the European Commission on classification of atypical transmissible spongiform encephalopathy (TSE) cases in small ruminants EFSA J., 2005, 276, 1-30.
- Hoop P. - A case control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J. Gen. Virol.*, 2006, 87, 3729 -3736.
- Fediaevsky A., Tongue S., Noremark M., Calavas D., Ru G.A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries *BMC Vet Res* 2010 4:19.



**Figura 1** - Andamento temporale dei focolai di scrapie classica e atipica.



**Figura 2** - Distribuzione per età dei casi italiani delle due forme di scrapie negli ovini e nei caprini.

# Integrazione con granelle di leguminose per la produzione di latte ovino biologico



A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, G. TORNAMBÉ, V. BELLINA, F. MAZZA, M.L. ALICATA

Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., sezione di Produzioni Animali, Università di Palermo

**Parole chiave:** cece, favino, pisello, latte ovino biologico.

**INTRODUZIONE** - Nell'alimentazione degli animali allevati in biologico, l'integrazione con concentrati costituiti da semplici miscele a base di granelle di leguminose, coltivate in azienda o reperibili localmente, possono costituire una valida alternativa ai mangimi commerciali che, contenendo mais e soia biologici OGM-free, risultano costosi e non privi del rischio di contaminazione da micotossine. Gli studi sull'uso di granelle di leguminose nella dieta degli ovini riguardano in larga misura la produzione di carne<sup>1,6</sup> mentre, tra i pochi lavori sulla produzione di latte ovino biologico<sup>2,4</sup>, manca un confronto diretto tra le specie leguminose più diffuse in ambiente mediterraneo. L'obiettivo della prova è quello di valutare gli effetti dell'integrazione con cece, favino o pisello proteico in miscela con orzo, come possibili alternative al mangime commerciale, sulla produzione e sulla qualità del latte ovino ottenuto in regime biologico.

**MATERIALI E METODI** - Sono state utilizzate 12 pecore di razza Comisana alloggiate in box individuali e suddivise in quattro gruppi omogenei per giorni di lattazione ( $92 \pm 9$  d), peso vivo ( $56 \pm 6$  kg) e produzione di latte ( $875 \pm 60$  g/d). Ciascun gruppo è stato alimentato con fieno a volontà e, seguendo lo schema di un quadrato latino  $4 \times 4$  per fasi di 14 d, con 800 g/d di uno dei seguenti concentrati isoazotati (3,7% di azoto sulla SS): a) 500 g di cece e 300 g di orzo; b) 450 g di favino e 350 g di orzo; c) 550 g di pisello proteico e 250 g di orzo; d) mangime del commercio contenente mais e soia. Negli ultimi 5 d di ciascuna fase, per ciascuna pecora sono state misurate e campionate la produzione di latte, le quantità somministrate e quelle residue di fieno e concentrato. Alla fine ed all'inizio di ogni fase si sono rilevati il peso vivo e il BCS delle pecore. Sugli alimenti sono stati determinati sostanza secca, proteina grezza, estratto etereo, ceneri e carboidrati strutturali. Il latte è stato analizzato per la determinazione di grasso, proteina, caseina, lattosio e cellule somatiche (CCS) (Combifoss 6000, Foss Italia), urea (CL-10 Plus, Eurochem, Italia) e dei parametri di coagulazione (Formagraph, Foss Italia), mentre è in corso di definizione la composizione in acidi grassi. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con la procedura MIXED del SAS 9.1.2<sup>5</sup>, usando un modello in cui l'effetto fisso è il tipo di concentrato e gli effetti casuali sono la fase e la pecora. Le differenze fra le medie sono state testate con il test "t" di Student ( $P \leq 0,05$ ).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I tre concentrati contenenti le granelle di leguminose (Tabella 1) sono stati maggiormente consumati rispetto al mangime commerciale, risultando quindi di buona appetibilità per le pecore. Poiché l'ingestione totale di fieno e concentrato non si è differenziata tra i gruppi, le pecore che ricevevano il mangime commerciale hanno compensato consumando più fieno, da cui la più alta ingestione di NDF. La miscela con cece e il mangime, più dotati in lipidi (3,9, 1,6, 1,6 e 5,1% sulla SS, per cece, favino, pisello e mangime), hanno comportato una maggiore ingestione in estratto etereo. La produzione individuale media di latte è stata superiore con il pisello e il favino rispetto al cece, mentre livelli intermedi sono stati registrati con il mangime. Il grasso del latte ha mostrato un trend rapportabile, per l'effetto diluizione, con la quantità di latte prodotta piuttosto che con l'ingestione lipidica. I tenori in proteina, caseina e urea del latte non hanno mostrato variazioni per effetto del concentrato, mentre il rapporto tra azoto (N) caseinico e N totale è migliorato con il cece. Non sono state rilevate differenze fra i gruppi anche per il contenuto in cellule somatiche e per i parametri di coagulazione del latte ( $r$ ,  $k_{20}$  e  $a_{30}$ ). L'efficienza di utilizzazione della proteina alimentare per la sintesi di caseina del latte ha mostrato valori più elevati per le pecore alimentate con pisello e favino. La migliore utilizzazione nutrizionale della componente azotata di tali leguminose potrebbe dipendere dalla loro migliore composizione aminocidica, o anche dalla loro maggiore degradabilità<sup>3</sup> che favorirebbe nel rumine la sincronia tra energia e proteina disponibili per la sintesi di proteina microbica. Tutte le pecore hanno mostrato un incremento di peso vivo e un miglioramento di condizione corporea tra l'inizio e la fine di ciascuna fase alimentare, senza che vi fossero differenze fra i gruppi. In definitiva, i risultati ottenuti dimostrano come l'uso di concentrati preparati in azienda miscelando l'orzo

**Tabella 1** - Effetto del tipo di concentrato sull'ingestione e sulla produzione di latte delle pecore.

	Cece	Favino	Pisello	Mangime
<b>Ingestione, g/d</b>				
SS del concentrato	702 a	702 a	678 a	587 b
SS totale	2320	2443	2359	2396
Proteina grezza	370	380	372	377
NDF	944 c	1044 ab	1006 b	1082 a
Estratto etereo	57,7 b	42,7 c	42,4 c	63,3 a
<b>Produzione di latte</b>				
Latte, g/d	654 b	710 a	718 a	677 ab
Lattosio, %	4,32	4,29	4,29	4,35
Grasso, %	7,66 a	7,11 b	7,22 b	7,29 ab
Proteina, %	6,74	6,86	6,73	6,58
Caseina, %	5,24	5,28	5,17	5,09
N caseinico/N totale	77,6 a	77,0 bc	76,8 c	77,2 b
Urea, mg/dl	37,6	38,8	37,5	38,3
CCS, log <sub>10</sub> 1000/ml	6,00	5,81	5,76	5,98
r, min	26,8	26,5	28,2	28,5
k <sub>20</sub> , min	1,80	1,82	2,68	1,91
a <sub>30</sub> , mm	47,2	53,1	48,4	41,4
<sup>1</sup> ESC	89,1 b	96,3 a	99,4 a	88,4 b

a,b,c =  $P \leq 0,05$ .

<sup>1</sup>ESC= efficienza sintesi caseina, in g caseina/kg PG ingerita.

con granelle di leguminose reperibili localmente non comporti un peggioramento delle caratteristiche quanti-qualitative della produzione di latte rispetto ad un mangime del commercio contenente mais e soia. Nel confronto tra le tre fonti proteiche non sono emerse differenze notevoli, tuttavia favino e pisello proteico sembrano consentire, a parità di proteina alimentare ingerita, una maggiore produzione ed una più elevata efficienza della sintesi di caseina del latte.

*Ricerca effettuata nell'ambito del progetto In.Fo.Pro. finanziato dall'Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana.*

## ■ Legume grains as dietary supplements in organic sheep milk production

**Key words:** chickpea, faba bean, pea, organic sheep milk.

## Bibliografia

- Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambé G., Mazza F., Di Miceli G., Fren-da A.S., Giambalvo D. (2009), Atti del IV Workshop GRAB-IT (Gruppo di Ricerca in Agricoltura Biologica - Italia) Ed. Università di Palermo, 311-316.
- Di Grigoli A., Pollicardo A., Mele M., Bonanno A., Tornambé G., Vargetto D. (2009), Options Méditerranéennes, Séries A: Mediterranean Seminars, 85, 459-464.
- Hadjapanaiou M. (2002). Animal Feed Science and Technology, 96, 103-109.
- Molle G., Decandia M., Cabiddu A., Acciaro M., Fois N., Sitzia M. (2009), Proceedings of the 13<sup>th</sup> Seminar of FAO-CIHEAM Sub-Network on sheep and goat nutrition, Leon (Spain) 14-16 October 2009 (Abst).
- SAS, 2004. SAS/STAT Qualification Tools User's Guide (version 9.1.2). Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Vasta V., Nudda A., Cannas A., Lanza M., Priolo A. (2008), Animal Feed Science and Technology, 147, 223-246.



# Efficacia dell'ivermectina verso nematodi gastrointestinali in allevamenti ovini e caprini in Campania



A. BOSCO<sup>1</sup>, D. PINTUS<sup>1</sup>, L. RINALDI<sup>1</sup>, A. SANTANIELLO<sup>1</sup>, M. SANTANIELLO<sup>1</sup>, I. GUARIGLIA<sup>1</sup>, G. COLES<sup>2</sup>, G. CRINGOLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Campania, Italia

<sup>2</sup> School of Clinical Veterinary Science, University of Bristol, Langford House, Bristol BS40 5DU, UK

**Parole chiave:** nematodi gastrointestinali, ovini, caprini, ivermectina, efficacia antiparassitaria.

**INTRODUZIONE** - La farmacoresistenza (FR) è considerata uno dei problemi più importanti per gli allevamenti ovini e caprini in diverse parti del mondo.

Lo sviluppo della FR dipende da numerosi fattori (legati all'ospite, al parassita, al farmaco ed all'ambiente) e si pone come un grosso ostacolo nei confronti delle produzioni del settore ovino e caprino.

La FR è stata riportata nei piccoli ruminanti in diverse parti del mondo nei confronti dei principali antelmintici. Un attento monitoraggio del fenomeno è fondamentale per una strategia di prevenzione e controllo dello sviluppo di FR su un determinato territorio (Jackson et al., 2000; Papadopoulos, 2008).

Nostre precedenti esperienze condotte in allevamenti ovini e caprini della Campania non hanno evidenziato FR verso diverse molecole, tra cui la ivermectina (IVM). Per ampliare le conoscenze su questo importante problema, è stato condotto uno studio in 10 allevamenti di piccoli ruminanti al fine di valutare l'efficacia della IVM a dosaggio pieno e dimezzato verso gli strongili gastrointestinali (SGI).

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato effettuato nel periodo Febbraio - Maggio 2010. Sono stati selezionati 8 allevamenti ovini e 2 caprini, ubicati in Campania, ciascuno con una consistenza media di circa 200 capi, naturalmente infestati da SGI. In ogni allevamento sono stati individuati 36 animali successivamente suddivisi in tre gruppi omogenei per età, stato fisiologico e stagione di pascolo, costituiti ognuno da 12 capi, come di seguito:

- allevamenti ovini: Gruppo IVM1 (trattato con Ivermectina 100 µg/Kg per via orale); Gruppo IVM2 (trattato con Ivermectina 200 µg/Kg per via orale); Gruppo Controllo (non trattato).
- allevamenti caprini: Gruppo IVM1 (trattato con Ivermectina 200 µg/Kg per via orale); Gruppo IVM2 (trattato con Ivermectina 400 µg/Kg per via orale); Gruppo Controllo (non trattato).

La tempistica seguita è stata la seguente:

T<sub>0</sub>: formazione dei gruppi, prelievo delle feci direttamente dall'ampolla rettale, valutazione del peso degli animali e trattamento.

T<sub>14</sub> e T<sub>21</sub>: valutazione efficacia antiparassitaria mediante Faecal Egg Count Reduction test (FECRT).

Tutti gli animali oggetto di studio sono stati sottoposti a prelievi di feci individuali ed analizzati singolarmente mediante la *FLOTAC basic technique* (Cringoli, 2006; Cringoli et al., 2010) utilizzando una soluzione satura di NaCl (p.s. 1.200).

La formula utilizzata per il calcolo della FECR (basata sulle medie aritmetiche) è stata la seguente:

$$FECR = 100 \times (1 - [UPG_t / UPG_0]) \quad (\text{Coles et al., 2006}).$$

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I risultati sono riassunti nella seguente tabella da cui, per ciascuno degli allevamenti oggetto di studio, si evincono i valori UPG di SGI nei diversi gruppi ed ai diversi tempi, nonché i valori di FECR.

Seguendo le linee guida *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* i valori di FECR sono risultati superiori al 95%. Pertanto, sia negli allevamenti ovini che caprini, l'IVM si è dimostrata efficace nei confronti degli SGI sia a dose piena che a metà dosaggio. In conclusione, i dati di questa ricerca confermano l'assenza di FR nei piccoli ruminanti in Campania.

■ **Efficacy of ivermectin against gastrointestinal nematoda in sheep and goat farms in the Campania region**

Allevamenti	Numero	Specie	Gruppo	T 0	T 14		T 21	
				UPG	UPG	FECR (%)	UPG	FECR (%)
1		Ovini	Controllo	384	149	–	96	–
			IVM1	489	0	100	2	97,9
			IVM2	531	1	99,3	2	97,9
2		Ovini	Controllo	343	304	–	256	–
			IVM1	781	1	99,7	2	99,2
			IVM2	396	0	100	1	99,6
3		Ovini	Controllo	225	122	–	104	–
			IVM1	290	0	100	2	98,1
			IVM2	497	0	100	2	98,1
4		Ovini	Controllo	285	175	–	82	–
			IVM1	178	2	98,9	3	96,3
			IVM2	126	0	100	1	98,8
5		Ovini	Controllo	47	42	–	32	–
			IVM	61	1	97,7	1	96,9
			IVM2	56	0	100	1	96,9
6		Ovini	Controllo	103	62	–	43	–
			IVM1	84	0	100	2	95,4
			IVM2	97	0	100	1	97,7
7		Ovini	Controllo	132	108	–	67	–
			IVM1	120	1	99,7	2	97
			IVM2	173	0	100	1	98,5
8		Ovini	Controllo	225	226	–	142	–
			IVM1	263	1	99,6	3	97,9
			IVM2	543	0	100	2	98,6
9		Caprini	Controllo	917	823	–	589	–
			IVM1	755	0	100	2	99,7
			IVM2	1149	0	100	1	99,8
10		Caprini	Controllo	1416	1674	–	1004	–
			IVM1	1655	3	98	3	99,7
			IVM2	2036	1	99,9	3	99,7

**Key words:** gastrointestinal nematoda, sheep, goats, ivermectin, efficacy.

## Bibliografia

- Coles G.C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Tjallier M.A., Vercruysse J., 2006. *Vet Parasitol*, 136:167-185.
- Cringoli G., 2006. *Parassitologia*, 48(3):381-4.
- Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J., 2010. *Nat Protoc.*, 5(3):503-15.
- Jackson F., Coop R. L., 2000. *Parasitology*, 120:95-107 Cambridge University Press.
- Papadopoulos E., 2008. *Small Ruminant Research*; volume 76, issue 1: pages 99-103.



# Curve di emissione del latte e stato sanitario della mammella in capre di razza Alpina



C. BOSELLI, G. GIANGOLINI, F. FILIPPETTI, S. AMATISTE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, - via Appia Nuova, 1411 - Roma -  
Centro Nazionale di Referenza per la qualità del latte e dei prodotti derivati degli ovini e dei caprini (CReLDOC)

**Parole chiave:** curva di emissione del latte, stato batteriologico, razza Alpina.

**INTRODUZIONE** - L'emissione del latte, caratteristica per ogni specie animale, risulta influenzata da numerosi fattori: anatomici, fisiologici, ambientali e sanitari. Nella ghiandola mammaria il latte è presente sia come frazione cisternale sia come frazione alveolare. La capra è caratterizzata da una considerevole quantità di latte cisternale<sup>3</sup> (40-80% rispetto al volume di latte totale) che condiziona il profilo di emissione. Le infezioni mammarie, sono spesso associate a valori elevati di cellule somatiche, oltre a peggiorare le caratteristiche qualitative e quantitative del latte prodotto possono modificare il profilo di emissione durante la mungitura<sup>4,6</sup>. L'obiettivo del presente studio è stato di valutare il profilo di emissione del latte in capre di razza Alpina, in relazione allo stato sanitario della mammella.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto in un allevamento di capre di razza Alpina, ubicato nella provincia di Roma, con 139 animali (96 pluripare, 43 primipare) nella prima fase di lattazione, munti con mungitrice meccanica (livello di vuoto 42 kPa, pulsazioni 90, rapporto 60:40). Da ciascuna emimammella è stato prelevato sterilmente un campione di latte durante la mungitura pomeridiana, previa disinfezione del capezzolo. I 278 campioni di latte, prelevati in pre-mungitura, sono stati sottoposti ad esame batteriologico (**EB**) (Agar Sangue, EMM) in linea con quanto indicato dal Bulletin FIL-IDF (1981). Successivamente con l'impiego del lattoflussometro elettronico LactoCorder (WMB AG, programma capre) sono state registrate 139 curve di flusso e autocampionati altrettanti campioni di latte individuali da sottoporre ad analisi citologica (Fossomatic 5000). I principali parametri che caratterizzano il profilo di emissione del latte (fase ascendente, fase di plateau, fase discendente, flusso massimo, flusso medio, etc.), sono descritti nel manuale di istruzione dello strumento<sup>7</sup>. Le Cellule Somatiche **CS** sono state trasformate in  $\text{Log}_{10}$ <sup>1</sup>. L'Analisi statistica è stata eseguita con SW MedCalc (versione 9.5.1) con analisi della varianza (Anova), i risultati sono presentati come media  $\pm$  errore standard, le correlazioni sono state eseguite con  $r$  di Pearson.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La percentuale delle emimammele positive ad **EB** è risultata del 17,6% (49/278). 99 (71,2%) animali sono risultati negativi, 31 (22,3%) hanno evidenziato un isolamento monolaterale e 9 (6,5%) un isolamento bilaterale. In accordo con i risultati di un nostro precedente lavoro<sup>5</sup>, gli Stafilococchi coagulanti negativi (**SCN**) sono risultati il principale gruppo di patogeni isolati con una percentuale del 81,6% (40/49) (Tabella 1).

Gli animali negativi ad **EB** (71,2%) hanno mostrato una produzione latte maggiore rispetto agli animali positivi (28,8%),  $1,01 \pm 0,05$  kg vs  $0,83 \pm 0,05$  kg,  $P < 0,05$ . Il contenuto in **CS** è risultato minore negli animali negativi ad **EB** rispetto a quelli positivi,  $5,26 \pm 0,05$   $\text{Log}_{10}/\text{ml}$  vs  $5,58 \pm 0,10$   $\text{Log}_{10}/\text{ml}$ ,  $P < 0,01$ , come riportato da altri AA<sup>4</sup>. Rispetto alle tre principali fasi di emissione del latte, la durata della fase ascendente ( $0,54 \pm 0,02$  min) prevale sulla fase discendente ( $0,50 \pm 0,03$  min) e sulla fase di plateau ( $0,39 \pm 0,05$  min). Durante la fase di plateau, si registra in genere, la maggiore quantità di latte prodotto con una correlazione di  $r = 0,72$ , ( $P < 0,01$ ). Il flusso massimo ( $1,11 \pm 0,03$  kg/min) ed il flusso medio ( $0,74 \pm 0,02$  kg/min), risultano simili a quanto riportato da altri AA<sup>2</sup>. Nella Tabella 2 sono riportati la produzione di latte, il numero delle **CS** ed i principali parametri della curva di flusso.

L'analisi statistica dei profili di emissione mostra come gli animali positivi ad **EB**, rispetto agli animali negativi, siano caratterizzati da una minore durata della fase di plateau ( $0,20 \pm 0,04$  min vs  $0,47 \pm 0,06$  min,  $P < 0,01$ ) ed una maggiore durata della fase discendente ( $0,59 \pm 0,06$  min vs  $0,46 \pm 0,03$  min,  $P < 0,05$ ).

Si registra inoltre che il contenuto in **CS** è correlato negativamente sia con la produzione di latte ( $r = -0,39$ ,  $P < 0,01$ ) sia con la durata della fase di plateau ( $r = -0,26$ ,  $P < 0,01$ ).

**Tabella 1** - Batteri isolati dal latte delle emimammele positive.

Germi isolati	n.	%
Stafilococchi coag. neg.	40	81,6
S. aureus	1	2,0
Str. uberis	5	10,2
Bacillus cereus	3	6,2
Totale	49	100,0

**Tabella 2** - Valori medi dei principali parametri rilevati.

Parametri rilevati	Negative (99)	Positive (40)	Totali (139)
Produzione di latte (kg)	$1,01 \pm 0,05^a$	$0,83 \pm 0,05^b$	$0,96 \pm 0,04$
Flusso massimo (kg/min)	$1,11 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,03$
Fase ascendente (min)	$0,53 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,02$
Fase di plateau (min)	$0,47 \pm 0,06^A$	$0,20 \pm 0,04^B$	$0,39 \pm 0,05$
Fase discendente (min)	$0,46 \pm 0,03^a$	$0,59 \pm 0,06^b$	$0,50 \pm 0,03$
Flusso medio (kg/min)	$0,74 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,02$
Latte di sgocciolatura (kg)	$0,03 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,02$
Tempo di mungitura (min)	$1,89 \pm 0,06$	$1,85 \pm 0,09$	$1,88 \pm 0,05$
CS $\text{Log}_{10}/\text{ml}$	$5,26 \pm 0,05^A$	$5,58 \pm 0,10^B$	$5,35 \pm 0,04$

Livelli di significatività: <sup>a-b</sup>  $P < 0,05$ , <sup>A-B</sup>  $P < 0,01$ .

In considerazione del fatto che i profili di emissione sono influenzati da numerosi fattori sarebbe necessario condurre ulteriori studi sulla cinetica di emissione del latte a livello di singola emimammella.

## ■ Milk flow curve and health status of mammary gland in alpine breed goats

**Key words:** milk flow curve, bacteriological status, Alpine goat.

## Bibliografia

- Ali, A.K.A.; Shook, G.E.: An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. J. Dairy Sci., 63 (1980), 487-490.
- P. Billon, P.- Guy Marnet, J.M. Aubry, Y. Dano, J. Maugras (2005). Influence of Pulsation parameters on Milking and udder health of Dairy Goats. ICAR technical series No 10 pp 137-146.
- Bruckmaier, R.M., and J.W. Blum. 1992. B-Mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during alpha- and beta-adrenergic agonist and oxytocin administration. J. Dairy Res. 59:151-159.
- G. Leitner, U. Merin, N. Silanikove (2004) Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. J Dairy Sci 87:6. 1719-1726 Jun.
- Rosati, R., Militello, G., Boselli C., Giangolini, G., Amatiste, S., Brajon, G., Gazzoni, S., Casini, M., Scatassa, M., Bono, P., Cannas, A., Mugoni, G., Simula, M., Denti, G., Gradassi, S., Fagiolo. (2005). - Determination of the national value of bulk tank somatic cell count and physiological threshold in sheep's and goats' milk. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia. vol. 56, pp. 161-181.
- V. Tancin B. Ipema & P. Hogewerf (2001). Milk flow patterns: interrelationship with somatic cell counts. ICAR technical series No 7 pp 277-278.
- www.lactocorder.ch (web site).

# La valutazione del rapporto uomo-animale nella specie ovina



A. BRAGHIERI, M. SCAVONE, A. M. RIVIEZZI, A. GIROLAMI, F. NAPOLITANO

Dipartimento di Scienze delle Produzioni animali, Università della Basilicata

**Parole chiave:** benessere animale, distanza di fuga, comportamento, ovini.

**INTRODUZIONE** - Il rapporto uomo-animale può rappresentare un importante parametro da inserire negli schemi di valutazione del benessere animale a livello aziendale. Esso può essere valutato mediante questionari rivolti agli addetti alla gestione degli animali, osservando il loro comportamento durante le operazioni routinarie di allevamento (mungitura, spostamenti degli animali) o mediante l'osservazione diretta del comportamento degli animali (Hemsworth e Coleman, 1998). Nei primi due casi gli addetti potrebbero non essere sinceri nelle risposte o modificare il loro comportamento. Il metodo di valutazione più attendibile sembra, dunque, essere l'osservazione diretta degli animali. Obiettivo del lavoro è quello di mettere a punto metodi di valutazione del rapporto uomo - animale da utilizzare per il monitoraggio del benessere nella specie ovina. Attualmente, infatti, non esistono metodi scientificamente validati per la valutazione di questo aspetto (Napolitano et al., 2009). Pertanto, è stata studiata la validità (relazione esistente tra la variabile misurata e ciò che essa dovrebbe valutare in termini di benessere), la ripetibilità (in termini di risultati ottenuti da uno stesso osservatore in occasioni differenti) e l'applicabilità dei parametri considerati.

**MATERIALI E METODI** - La prova ha riguardato 20 aziende ovine, ubicate nella provincia di Potenza. Il numero di animali testati è variato in relazione alla numerosità del gregge (Cochran, 1977). Il protocollo messo a punto per le visite aziendali prevedeva la somministrazione di un questionario diviso in quattro sezioni agli addetti (atteggiamento generale, facilità di lavoro con gli animali, comportamento adottato nei confronti degli animali e soddisfazione nel lavoro), ai quali è stato chiesto di indicare il grado di concordanza con alcune affermazioni, utilizzando una scala a sette punti. Successivamente, sono stati condotti due test di avvicinamento (distanza di fuga alla mangiatoia e nel box di allevamento). Tali test consistono nell'avvicinarsi lentamente (circa 1 m/sec) ad un animale con il braccio leggermente sporgente in avanti, fino a quando questo si ritrae (Waiblinger et al., 2006). I test di avvicinamento sono stati eseguiti due volte, ad una settimana di distanza, al fine di valutare la ripetibilità dei risultati, calcolata utilizzando il coefficiente ( $r$ ) di Pearson. La validità dei due test è stata stimata mediante la correlazione (coefficiente  $r$  di Pearson) tra la distanza di fuga all'interno del box e la distanza di fuga alla mangiatoia, nonché tra queste e i punteggi del questionario.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il punteggio medio del questionario è risultato superiore al punto neutro ( $4,58 \pm 0,64$ ); pertanto, l'atteggiamento degli addetti nei confronti degli animali e degli aspetti generali del lavoro si può ritenere abbastanza positivo. Analogamente a quanto rilevato nelle bufale (Napolitano et al., 2005), la distanza di fuga all'interno del box è risultata maggiore rispetto a quella alla mangiatoia ( $239,38 \pm 61,83$  vs.  $65,78 \pm 28,85$  cm;  $P < 0,001$ ). Entrambi i test di avvicinamento (nel box e alla mangiatoia) sono risultati altamente ripetibili nel tempo ( $P < 0,001$ ; Tabella 1). Tale risultato indicherebbe che il grado di similitudine tra misure ripetute in condizioni analoghe è elevato, conferendo affidabilità ad entrambi i parametri.

Tra i due test di avvicinamento è stata rilevata una correlazione positiva e significativa ( $P < 0,05$ ). Viceversa, il punteggio del questionario risulta correlato negativamente, sia con la distanza di fuga all'interno del box, seppur non significativamente ( $P > 0,05$ ), sia con la distanza di fuga alla mangiatoia ( $P < 0,05$ ; Tabella 2).

La correlazione negativa tra i punteggi del questionario e la distanza di

**Tabella 1** - Stima della ripetibilità dei test di avvicinamento mediante il coefficiente di correlazione di Pearson ( $r$ ).

	Distanza di fuga	
	Box	Mangiatoia
$r$	0,898	0,845
P	0,001	0,001

**Tabella 2** - Correlazioni ( $r$ ) tra i test di avvicinamento e tra questi e il punteggio del questionario.

	Questionario		DF <sup>2</sup>	
	$r$	P	$r$	P
DFM <sup>1</sup>	-0,435	0,05	0,445	0,05
DF <sup>2</sup>	-0,248	0,291	-	-

<sup>1</sup> Distanza di fuga alla mangiatoia. <sup>2</sup> Distanza di fuga nel box.

fuga alla mangiatoia indicherebbe la validità di quest'ultima per la valutazione della qualità del rapporto uomo - animale negli allevamenti ovini. Tale correlazione, infatti, confermerebbe che atteggiamenti negativi dell'uomo si traducono in un comportamento negativo nei confronti degli animali, che a loro volta mostrano un aumento del grado di timore, con inevitabili ripercussioni sfavorevoli sul benessere animale e sulla produttività (Hemsworth, 2003).

Oltre ad un alto grado di validità e ripetibilità, la distanza di fuga alla mangiatoia presenta anche un'elevata applicabilità, in termini di costi e tempi di rilevamento ridotti, malgrado sia indispensabile prevedere un adeguato periodo di addestramento per i rilevatori.

## Assessment of human-animal relationship in sheep

**Key words:** animal welfare, avoidance distance, behaviour, sheep.

## Bibliografia

- Cochran, W.G., 1977. Sampling techniques. Wiley & Sons, New York, USA.
- Hemsworth, P.H., 2003. Human-animal interactions in livestock production. Appl. Anim. Behav. Sci., 81: 185-198.
- Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., 1998. Human-livestock interactions. The stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals. CAB International ed., Wallingford, UK.
- Napolitano, F., Grasso, F., Bordini, A., Tripaldi, C., Saltalamacchia, F., Pacelli, C., De Rosa, G., 2005. On farm welfare assessment in dairy cattle and buffaloes: evaluation of some animal - based parameters. Ital. J. Anim. Sci., vol. 4: 223-231.
- Napolitano, F., De Rosa, G., Ferrante, V., Grasso, F., Braghieri, A., 2009. Monitoring the welfare of sheep in organic and conventional farms using an ANI 35 L derived method. Small Ruminant Research 83: 49-57.
- Waiblinger, S., Boivin, X., Pedersen, V., Tosi, M.V., Janczak, A.M., Visser, E.K., Jones, R.B., 2006. Assessing the human-animal relationship in farmed species: A critical review. Appl. Anim. Behav. Sci., 101: 185-242.

# Integrazione della dieta di pecore da latte con lino estruso: effetti sulle caratteristiche chimiche e sensoriali del formaggio



R. BRANCIARI<sup>1</sup>, A. VALIANI<sup>4</sup>, L. MUGHETTI<sup>2</sup>, D. MIRAGLIA<sup>1</sup>, D. RANUCCI<sup>1</sup>, G. ACUTI<sup>2</sup>, S. ESPOSTO<sup>3</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Economiche-Estimate e degli Alimenti

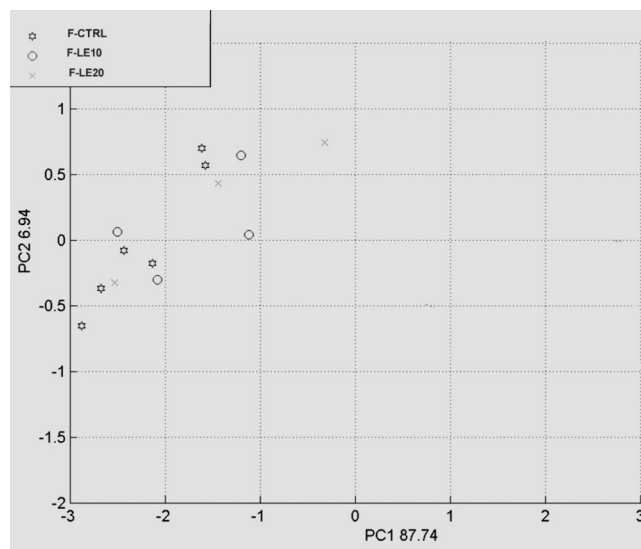
<sup>4</sup> Università degli Studi di Perugia. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** lino estruso, ovini, formaggio, caratteristiche sensoriali.

**INTRODUZIONE** - La somministrazione di diete integrate da livelli appropriati di oleaginose come il lino si è rivelata in grado di migliorare le caratteristiche compositive del latte e formaggio ovino dal punto di vista nutraceutico, in riferimento soprattutto al contenuto in CLA (acido linoleico coniugato) o in acidi grassi della serie omega-3 (Gomez-Cortes et al., 2009). Tuttavia, una conseguenza dell'impiego di tali diete potrebbe essere lo sviluppo di odori e sapori indesiderati nei prodotti, in grado di influenzare negativamente la scelta da parte del consumatore (Chilliard et al., 2004). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le caratteristiche chimiche e sensoriali di formaggio pecorino ottenuto utilizzando latte di animali alimentati con differenti livelli di lino estruso.

**MATERIALI E METODI** - La raccolta del latte e la produzione del formaggio sono state effettuate nel periodo febbraio-maggio 2008. La sperimentazione ha previsto l'impiego di tre gruppi di pecore di razza sarda (20 animali per gruppo) alimentati con fieno polifita e mangime integrato con diverse percentuali di lino estruso a partire da un mese prima fino a due mesi dopo il parto. I mangimi impiegati, isoeenergetici ed isoproteici, sono stati i seguenti: un "controllo" privo di lino (CTRL) e due integrati rispettivamente con il 10% (LE10) ed il 20% (LE20) di lino estruso. Gli animali, dopo lo svezzamento degli agnelli (effettuato a 40 gg dal parto), sono stati munti due volte al giorno mediante mungitura meccanica. La caseificazione è stata effettuata separatamente per i tre gruppi sperimentali, con latte sottoposto a termizzazione (65 °C per 10 secondi) e inoculato con starter selezionati. I formaggi (F-CTRL, F-LE10, F-LE20) sono stati posti a stagionare in cella condizionata (T 12°C, 85% U.R.) per 60 gg; al termine del periodo di stagionatura sono stati analizzati per la composizione chimica (AOAC, 2000). La composizione acidica dei formaggi è stata determinata per via gas-cromatografica sulla frazione lipidica sottoposta a metilazione, secondo il metodo descritto da Folch et al. (1957). Campioni di formaggio provenienti dai diversi gruppi sperimentali sono stati sottoposti ad analisi sensoriale mediante *consumer test*. Gli stessi campioni sono stati inoltre sottoposti ad analisi strumentale con naso elettronico. Le misure al naso elettronico sono state condotte con un sistema olfattivo elettronico di sensori ad ossidi di metallo (EOS<sup>835</sup> - Sacmi, Imola), con campionamento a spazio di testa statico. I valori ottenuti sono stati elaborati mediante un modello di analisi statistica multivariata per l'analisi delle componenti principali (PCA).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La composizione chimica del formaggio non ha mostrato delle variazioni significative in relazione al trattamento (dati non riportati). Il profilo acidico è invece risultato modificato dalla dieta; in particolare, la concentrazione dei CLA e dei grassi della serie omega-3 è aumentata in tutti i gruppi che ricevevano lino, in relazione al livello di integrazione (dati non riportati). Risultati simili sono stati riportati anche da Zhang et al. (2006) che hanno utilizzato quantità sovrapposibili di lino. I formaggi ottenuti dai gruppi alimentati con lino hanno presentato, secondo i consumatori, un odore di pecorino meno spiccato rispetto al controllo ( $P < 0,01$ ). Inoltre, la consistenza è risultata significativamente maggiore nei formaggi ottenuti dai gruppi F-LE10 ed F-LE20 ( $P < 0,01$ ). La valutazione relativa alla presenza di odori e sapori estranei non ha consentito di mettere in evidenza una differenza tra i gruppi. Il sapore di pecorino è risultato essere più intenso nei formaggi ottenuti dal gruppo F-LE10 rispetto al controllo ( $P < 0,01$ ); tali campioni hanno anche ottenuto un giudizio tendenzial-



**Figura 1** - Score plot del modello PCA dei campioni di formaggio.

mente migliore ( $P=0,06$ ) per quanto riguarda l'accettabilità complessiva. Secondo la valutazione dei consumatori non risulterebbero quindi particolari controindicazioni all'impiego di lino nella dieta degli ovini. Per quanto riguarda le analisi condotte con il naso elettronico non sono state riscontrate differenze di aroma tra i formaggi, infatti lo score plot del modello PCA dei campioni analizzati non ha messo in evidenza alcuna distinzione degli oggetti in funzione delle diverse integrazioni di lino (Figura 1).

In conclusione, questa ricerca conferma l'effetto positivo delle diete a base di lino su alcune importanti caratteristiche nutrizionali del formaggio (aumento della concentrazione in CLA e in acidi grassi della serie omega-3). L'analisi del *consumer test* ha permesso di verificare che le integrazioni di lino impiegate nella sperimentazione non hanno conferito al formaggio odori e sapori indesiderati, il naso elettronico non ha individuato caratteristiche olfattive differenti tra i diversi campioni.

**Supplementation of the diet of dairy sheep with extruded linseed: effects on chemical and sensory characteristics of cheese**

**Key words:** extruded linseed, sheep, cheese, flavour.

## Bibliografia

- Chilliard, Y., Ferlay, A. (2004). *Reprod. Nutr. Dev.* 44 (2004)467-492.  
 Gomez-Cortes P., Luna P., Bach A., Jarez M., de la Fuente M.A., J.Dairy Sci, 91, 20-28.  
 AOAC (2000) - Methods of analysis of AOAC International, 17th edn., Arlington, VA.  
 Folch et al., *J Biol Chem* 1957, 226, 497.  
 Zhang R., Mustafa A.F., Zhao X. (2006), *Small Rumin. Res.*; 63:233-241.

# Elettroforesi bidimensionale del proteoma di *Streptococcus uberis* per l'identificazione di biomarcatori diagnostici nelle mastiti ovine



F. CAMPESI<sup>1</sup>, G. MAROGNA<sup>2</sup>, G. SCHIANCHI<sup>2</sup>, S. UZZAU<sup>1</sup>, G.S. LEORI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche, sez. di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università di Sassari

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"

**Parole chiave:** proteomica, *S. uberis*, mastiti ovine, biomarcatori diagnostici.

**INTRODUZIONE** - In una recente indagine epidemiologica condotta in Sardegna e pubblicata nel 2010, lo *Streptococcus uberis* risulta essere il primo agente eziologico isolato dal latte in quadri di mastite infettiva negli ovini. L'Elettroforesi Bidimensionale è una tecnica di separazione su gel di acrilammide che consente di processare centinaia di proteine per volta, è tra le metodiche più frequentemente adottate per semplicità di esecuzione, costo ridotto ed informazioni ottenibili. La tecnica sfrutta la duplice separazione di miscele complesse di proteine: nella prima dimensione la migrazione delle proteine avviene in funzione del loro punto isoelettrico, nella seconda dimensione avviene in base al peso molecolare. Tramite isoelettrofocalizzazione i composti anfoteri, come aminoacidi e peptidi, vengono separati in un campo elettrico lungo il quale viene stabilito un gradiente di potenziale e di pH, stabili. Gli estremi di pH vengono scelti sulla base dei punti isoelettrici dei componenti da separare. Le proteine possono successivamente essere visualizzate con diversi protocolli di colorazione (blu Coomassie, colorazione argentea, fluorocromi o composti radiomarcanti). Il risultato è una mappa di macchie o spot che possono essere ulteriormente separati, identificati e caratterizzati dopo il loro trasferimento su supporto solido per essere identificate mediante anticorpi specifici (Western Blotting) o per essere ulteriormente caratterizzate in seguito a digestione con enzimi proteolitici (es. spettrometria di massa MALDI-TOF).

**MATERIALI E METODI** - Le colture batteriche sono state lavate 3 volte in PBS e centrifugate a 12.000 rpm per 5 minuti. Al pellet di batteri sono stati aggiunti 400 µl di Tampone di lisi (0.1M Tris, 1%SDS) precedentemente incubato a 100°C. La sospensione è stata poi incubata a 100°C per 10 minuti. Le proteine presenti nel lisato sono state quantizzate con il kit "DC Protein Assay" della Bio-rad prima di essere fatte precipitare con l'aggiunta di due volumi di acetone e la successiva incubazione a -20°C di due ore. Il pellet ottenuto centrifugando a 10.000 x g per 20 minuti a 4°C, è stato riscosso nel tampone di Estrazione (7M UREA, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 1mM PMSE, 1mMEDTA, 10U/ml di DNasiI, 10U/ml di RnasiA) e incubate per un'ora a temperatura ambiente. L'estratto è stato congelato a -20°C. Il giorno dopo 300 µg di proteine sono state diluite in 125 µl di Tampone di Reidratazione (8M Urea, 4% CHAPS, 1% DTE, 1% Anpholine) e utilizzate per reidratare o/n ciascuna delle due strip da 7 cm, range di pH 4-9. L'isofocalizzazione è stata realizzata in modalità gradiente con un Multiphor II (GE-Pharmacia) dotato di un alimentatore EPS 3501/XL (GE-Pharmacia) secondo il seguente programma: al termine della isofocalizzazione le strip sono state trattate per 13 minuti in una Soluzione Riducente (6M Urea, 30% Glicerolo, 50mM TRIS-HCl pH 8.8, 2% SDS, 1% DTE) e per 13 minuti in una Soluzione Alchilante (6M Urea, 30% Glicerolo, 50mM TRIS-HCl pH 8.8, 2% SDS, 2.5% Iodoacetamide). Al termine dell'alchilazione le strip sono state lavate in Tampone di Corsa (0.025 mM TRIS Base, 0.192 M Glicina, 0.1M SDS) e montate su un gel di Acrilammide al 10% per la seconda dimensione. Lateralmente alle strip sono stati inseriti 2 pezzi di carta 3MM (3mm x 3mm) imbibiti con 7 µl di Marker (BenchMark Prestained Protein Ladder- Invitrogen). La strip è stata bloccata sul gel con una Soluzione Sigillante (Low Melting Point Agarose 0.5%, 0.002% Blu di Bromofenolo in Tampone di Corsa). La

corsa è stata eseguita su un apparato Elettroforetico Bio-Rad Mini Protean 3. L'alimentazione, inizialmente impostata a voltaggio costante per 15 minuti a 50 V, è stata successivamente portata a 150V per 1 ora. Il gel destinato ad essere colorato con il Coomassie Colloidale G<sup>20</sup> è stato fissato secondo la sequenza:

1. 3 lavaggi da 30 minuti nella Soluzione di Fissazione (30% Etanolo, 2% Acido Fosforico 85%, in H<sub>2</sub>O mQ);
2. 3 lavaggi da 30 minuti nella Soluzione di Lavaggio (2% Acido Fosforico 85%, in H<sub>2</sub>O mQ);
3. 1 lavaggio da 30 minuti nella Soluzione di Equilibratura (15% Solfato di Ammonio, 18% Etanolo, 2% Acido Fosforico 85%, in H<sub>2</sub>O mQ);
4. immersione per 36 ore nella Soluzione di Colorazione (15% Solfato di Ammonio, 18% Etanolo, 2% Acido Fosforico 85%, 0.004% Coomassie Brilliant Blu in H<sub>2</sub>O mQ).

Al termine della colorazione l'eccesso di colorante è stato eliminato con dei lavaggi in acqua deionizzata. Il gel è stato successivamente immerso per 5 minuti nella Soluzione di Essiccamento (10% Etanolo, 4% Glicerolo, in H<sub>2</sub>O mQ), quindi essiccato per 24 ore a temperatura ambiente tra due fogli di Cellophane (DryEasy - Invitrogen).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - L'analisi elettroforetica bidimensionale è stata inizialmente condotta in un range di pH 3-10 al fine di individuare l'intero proteoma di *Streptococcus uberis*. Dall'analisi del profilo elettroforetico ottenuto si è osservato che la grande maggioranza degli spot proteici era localizzata in range di pH (acido) relativamente ristretto. Per questo motivo le successive separazioni degli estratti proteici è stata realizzata in un range di pH 4-7. Le proteine sottoposte a elettroforesi 2D sono state analizzate mediante immunoblotting su membrane di nitrocellulosa. Sono stati utilizzati 17 sieri di pecore con mastite da *S. uberis* e un pool di controlli negativi. Alcuni spot sono stati identificati in tutte le membrane. In base alla posizione, i singoli spot sono stati identificati anche nei gel colorati in blu Coomassie. Dopo l'identificazione degli spot di interesse, questi sono stati prelevati dal gel e analizzati mediante spettrometria di massa (Maldi-Tof). Sono attualmente in corso le indagini per valutare il loro possibile utilizzo come markers specifici dello *Streptococcus uberis*. In particolare, una di queste proteine risulta interessante come probabile biomarker specifico di *S. uberis*. L'analisi della sua sequenza, utilizzando la banca dati ed i software resi disponibili al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, ha permesso di evidenziare, con uno Score di 1092 e un E Value di 0.0, un'omologia di sequenza pari al 100% con una proteina di *S. uberis*. L'analisi BLAST successiva, non ha evidenziato significative omologie per proteine predette in altri batteri, incluso il genere *Streptococcus*. Questo candidate biomarker, pur trattandosi di un risultato preliminare, rende promettente un suo possibile utilizzo nell'allestimento di un saggio ELISA specifico per la diagnosi delle mastiti da *S. uberis*.

*Ringraziamenti:* questo lavoro è stato finanziato al CRENMOC con il progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute RC IZS SA 05/04.

■ 2D PAGE proteomic maps of *Streptococcus uberis* to obtain diagnostic markers in ovine mastitis

**Key words:** proteomics, *S. uberis*, ovine mastitis, biomarker discovery.



# Aspetti della produzione dei piccoli ruminanti con impatto sulla salute umana



A. CAROLI<sup>1</sup>, S. CHESSA<sup>2</sup>, D. RIGNANESE<sup>1</sup>, M. MARTINI<sup>3</sup>, F. SALARI<sup>3</sup>,  
I. ALTOMONTE<sup>3</sup>, C. CASOLI<sup>4</sup>, M. PAUSELLI<sup>4</sup>, M.L. ALICATA<sup>5</sup>, A. BONANNO<sup>5</sup>,  
G. GARRO<sup>6</sup>, R. MAURIELLO<sup>6</sup>, L. CHIANESE<sup>6</sup>, P. SACCHI<sup>7</sup>

<sup>1</sup> DSBB, Università degli Studi di Brescia

<sup>2</sup> IBBA, CNR, Milano

<sup>3</sup> DPA, Università degli Studi di Pisa

<sup>4</sup> Dipartimento di Biologia Applicata, Università degli Studi di Perugia

<sup>5</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., sezione di Produzioni Animali, Università degli Studi di Palermo

<sup>6</sup> DSA, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici, NA

<sup>7</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino

**Parole chiave:** piccoli ruminanti, produzioni, salute umana.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi anni l'attenzione del consumatore si è sempre più orientata verso le caratteristiche nutrizionali degli alimenti. Queste proprietà sono di grande importanza anche per quanto riguarda le produzioni dei piccoli ruminanti. Il presente lavoro ha lo scopo di riassumere i principali risultati emersi dal progetto di ricerca PRoSAL, che ha voluto indagare alcuni aspetti della produzione dei piccoli ruminanti di particolare impatto sulla salute umana.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati analizzati mediante i metodi descritti in letteratura: 1) i polimorfismi genetici dei biopeptidi del latte dei piccoli ruminanti; 2) le attività di alcuni enzimi della membrana del globulo di grasso e la frazione lipidica del latte ovino; 3) gli indicatori dello stato di benessere della pecora e della qualità nutrizionale del latte e del formaggio in relazione all'intensità di pascolamento; 4) le componenti bioattive di sieri residui alla produzione dei formaggi ovi-caprini; 5) la resistenza genetica alle encefalopatie spongiformi trasmissibili e l'efficienza economica e biologica in razze ovine.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Verranno esposti nell'ordine sopraindicato:

- 1) È stato effettuato uno studio *in silico* per identificare le differenze a livello di peptidi bioattivi legate alle sequenze lattoproteiche dei piccoli ruminanti e alla presenza di polimorfismo genetico (Chessa et al., 2010a). Sono stati implementati modelli sperimentali *in vitro* per la valutazione del trasporto del calcio (Caroli et al., 2009). I nostri risultati suggeriscono un effetto differenziale dei differenti peptidi sulla deposizione del calcio nella matrice extracellulare. La distribuzione delle varianti genetiche e dei più interessanti peptidi sono descritte nella capra Buren (Küpper et al., 2010) e Garfagnina (Rignanese et al., 2009) e nella pecora Massese, Garfagnina, Pomarancina, Zerasca (Chessa et al., 2010b).
- 2) Sono state evidenziate le relazioni tra l'attività di alcuni enzimi di membrana, le dimensioni dei globuli di grasso e alcuni acidi grassi del latte (Martini et al., 2010). È stata inoltre valutata l'attività enzimatica di 5 proteine di membrana del globulo di grasso estratte dal colostro e dal latte di pecora Massese nel corso della lattazione. L'attività della  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi è massima nei primi 10 giorni di lattazione come riportato anche in studi su latte bovino (Zanker et al., 2001); la xantina ossidasi ha il picco a 45gg *post partum*, mentre la 5'-nucleotidasi aumenta successivamente. La fosfatasi alcalina aumenta al progredire della lattazione, mentre la xantina deidrogenasi non mostra variazioni. Le proteine totali di membrana (mg/ml) mostrano il valore maggiore a 12 ore *post partum*.
- 3) Sono state confrontate due strategie di pascolamento: continuo estensivo (EST) con carico pari a 8 capi per 1,5 ha e continuo intensivo (INT) con carico di 1 capo/40 m<sup>2</sup>/d con una integrazione giornaliera di 400 g/capo/d di concentrato. La strategia di pascolamento non ha determinato effetti statisticamente significativi sul livello produttivo degli animali e sulle caratteristiche qualitative del latte fatta eccezione per il tenore di urea, superiore nel latte del gruppo EST rispetto al gruppo INT, in accordo con quanto osservato da Schon (2008) in bovine da latte sottoposte a due diversi regimi di pascolamento. Lo studio degli effetti della specie foraggera pascolata (cicoria, sulla e consociazione avena-trifoglio alessandrino) e della tecnica di pascolamento (continuo vs turnato) ha evidenziato migliori risposte produttive nelle pecore da latte che hanno utilizzato la cicoria e pascolato con metodo continuo. Sono inoltre

analizzati gli effetti sulle proprietà salutistiche dei prodotti lattiero caseari ovini.

- 4) Gran parte dei peptidi identificati mediante spettrometria di massa in sieri residui alla lavorazione di formaggi ovi-caprini è di origine caseinica. Le frazioni più idrolizzate sono  $\alpha_{s1}$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN e  $\beta$ -CN, seguite da  $\kappa$ -CN,  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. Le bioattività sono: antipertensiva, morfino-simile, antimicrobica e *carrier* di minerali. Questa è esibita dai fosfopeptidi (CFP) le cui sequenze primarie e il relativo numero di fosfati sono risultati correlati a specie, tecnologia di produzione e composizione fenotipica del latte massale. Nel siero ovino sono stati trovati 52 peptidi (di cui 6 CFP) derivanti dalla  $\beta$ -CN, 14 (3 CFP) dalla  $\kappa$ , 2 dall' $\alpha_{s1}$  e 2 dall' $\alpha_{s2}$ -CN (1 fosforilato). L'elevata presenza di alleli "deboli" di  $\alpha_{s1}$ -CN ha determinato, nel siero residuo alla lavorazione del Caciocotta caprino, la produzione prevalente di CFP derivanti da  $\alpha_{s2}$ -CN e  $\beta$ -CN rispetto a quello caratterizzato da alleli "forti" dove sono stati identificati anche CFP derivanti dall' $\alpha_{s1}$ -CN.
- 5) Per studiare le relazioni tra genotipo al locus PRNP e caratteristiche morfologiche sono stati considerati 112 e 180 ovini di razza Biellese e Sambucana tipizzati al locus PRNP. Su ciascun individuo sono stati rilevati mediante analisi di video-immagini alcuni indici biometrici. L'impatto della selezione per la resistenza alla *scrapie* a medio-lungo termine è stato valutato nella Sambucana analizzando 14 microsatelliti non associati al gene PRNP in due gruppi di maschi nati rispettivamente prima e dopo l'applicazione del programma selettivo. La popolazione ha conservato la variabilità genetica nonostante la pressione selettiva alla quale è sottoposta. L'evoluzione della popolazione simulata per i prossimi 50 anni indica una perdita di variabilità modesta (Sartore et al., 2010).

Ricerche eseguite con finanziamento Prin 2007XT947K.

## ■ Small ruminant production and human health

**Key words:** small ruminants, production, human health.

## Bibliografia

- Caroli A., Bulgari O., Chessa S., Cocchi D., Tulipano G. (2009), Italian Journal of Animal Science. 8 (2): 42-44.
- Chessa S., Bulgari O., Rignanese D., Ceriotti G., Tulipano G., Caroli A.M. (2010a), Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia. 61: 47-56.
- Chessa S., Rignanese D., Berbenni M., Ceriotti G., Martini M., Pagnacco G., Caroli A. (2010b), Small Ruminant Research 88: 84-88.
- Küpper J., Chessa S., Rignanese D., Caroli A., Erhardt G. (2010), Journal of Dairy Research 77: 56-62.
- Schon F. (2008) Proceedings of IFOAM Organic World Congress Modena 16-20 giugno 2008. 48-50.
- Rignanese D., Chessa S., Ceriotti G., Salari F., Martini M., Caroli A. (2009). 17th Int. Congr Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants, 27-30 May 2009, Perugia, Italy, 143.
- Martini M., Salari F., Pesì R., Tozzi M.G. (2010), International Dairy Journal; 20:61-64.
- Zanker I.A., Hammon H. M., Blum J. M. (2001), Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine; 48: 179-185.
- Sartore S., Rasero R., Colussi S., Acutis, P.L., Peletto S., Soglia D., Maione S., Spalenza V., Sacchi P. (2010) 61st Annual Meeting EAAP, Heracleion 23rd-27th August 2010, Greece.



# Effetto del trattamento del favino su degradabilità ruminale e FAN



E. CESTOLA<sup>1</sup>, L. MUGHETTI<sup>2</sup>, G. ACUTI<sup>2</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>2</sup>, S. DE VINCENZI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Applicata, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** favino, ovini, FAN, degradabilità ruminale.

**INTRODUZIONE** - Il favino costituisce un'interessante coltura sia in termini nutrizionali che agronomici. Tuttavia, la presenza di fattori antinutrizionali e l'elevata degradabilità delle proteine possono limitarne l'impiego in alimentazione animale, rendendo necessari trattamenti industriali in grado di migliorarne la digeribilità. Pertanto, obiettivo della presente sperimentazione è stato quello di verificare l'efficacia dei trattamenti d'imbibizione e micronizzazione sul tenore dei principali fattori antinutrizionali (FAN) e sulla degradabilità ruminale *in vivo* della sostanza secca (SS) e della proteina greggia (PG) di una partita commerciale.

**MATERIALI E METODI** - Le prove sono state condotte su 6 pecore munite di fistola ruminale, divise in tre gruppi da due soggetti ciascuno, corrispondenti a tre trattamenti di una stessa varietà di favino: crudo (C), bagnato (B) - 16 ore di imbibizione - e micronizzato (M), secondo un disegno sperimentale a quadrato latino con replica, con periodi di adattamento di 15 giorni. Le degradabilità ruminali *in situ* della SS e della PG sono state determinate con la tecnica delle *nylon bags* (Ørskov e McDonald, 1979) con tempi di incubazione pari a 0, 2, 4, 8, 14, 24 e 48 ore. Le tre diete erano costituite sul secco da fieno di prato polifita (1.320 g), mais granella (180 g) e 135 g d/capo di favino crudo, micronizzato o bagnato. Prima di procedere alle prove di degradabilità, le tre tipologie di favino sono state sottoposte a determinazioni dei principali FAN per verificare eventuali variazioni conseguenti ai trattamenti sopra citati. I parametri di degradabilità sono stati ricavati mediante l'equazione suggerita da Ørskov e McDonald (1979). I parametri di degradabilità effettiva della SS (DESS) e della proteina (DEPG) sono stati stimati rispettivamente mediante il software Nway (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK) e la PROC NLIN SAS (Mavrogenis e Hadjipanayiotou, 1997) sulla base dell'equazione proposta da Mc Donald (1981), analizzando valori di *k* (*outflow rate*) pari a 2, 5 e 8 (%/h) e poi sottoposti ad analisi della varianza (SAS, 2005).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Come atteso, entrambi i trattamenti hanno fatto registrare riduzioni marcate degli inibitori della tripsina e dei fitati (Tab. 1), mentre i tenori in vicina e convicina sono stati modificati principalmente in seguito all'applicazione dell'imbibizione ed in misura ridotta con la micronizzazione. Il contenuto in polifenoli totali è variato di poco, sia dopo l'imbibizione che dopo la micronizzazione, mentre si è ridotto, seppur in misura minima, quello in tannini condensati, soprattutto con l'imbibizione. La micronizzazione non ha determinato riduzioni di notevole rilievo e, anzi, se paragonata ad altri trattamenti, sembrerebbe agire in minor misura nel contrastare l'effetto negativo dei tannini, risultando maggiormente efficace verso gli inibitori della tripsina, con riduzioni dell'attività antitripsinica (AAT) del 92,47%. Per quanto riguarda i fitati, l'effetto dei due trattamenti si è rivelato invece piuttosto simile. Si può quindi desumere che l'imbibizione determini una diminuzione in alcuni FAN, a volte anche più marcata rispetto alla micronizzazione, con riscontri positivi ai fini della migliore utilizzazione del favino, anche se si deve tener conto dell'effetto di diluizione su proteina e zuccheri e delle difficoltà di preparazione. Dalle prove condotte è emerso inoltre che la SS del favino M è più degradabile rispetto a quella di C e B, come deducibile dai parametri relativi alla cinetica riportati in Tabella 2, con valori di *a* (frazione rapidamente de-

**Tabella 2** - Cinetica di degradazione e parametri di degradabilità effettiva della SS e della PG del favino A-C: P<0,01; a-c: P<0,05.

Variabile		Trattamento			ES
		Crudo	Bagnato	Micronizzato	
Cinetica di degradazione della SS					
a	%	18,94 <sup>ab</sup>	15,14 <sup>b</sup>	25,87 <sup>a</sup>	6,53
b	%	71,38 <sup>ab</sup>	78,61 <sup>a</sup>	65,93 <sup>b</sup>	6,30
c	% / h	11,78 <sup>b</sup>	11,55 <sup>b</sup>	20,23 <sup>a</sup>	0,06
a+b	%	90,32 <sup>b</sup>	93,75 <sup>a</sup>	91,81 <sup>ab</sup>	1,82
Degradabilità effettiva (DESS)					
K=0,02	% / h	79,50	73,09	85,73	10,74
K=0,05	% / h	68,50 <sup>B</sup>	64,96 <sup>B</sup>	78,45 <sup>A</sup>	5,24
K=0,08	% / h	61,00 <sup>B</sup>	61,12 <sup>B</sup>	72,85 <sup>A</sup>	4,33
Cinetica di degradazione della PG					
a	%	47,29 <sup>A</sup>	35,94 <sup>B</sup>	24,44 <sup>C</sup>	0,85
b	%	50,51 <sup>C</sup>	62,09 <sup>B</sup>	72,24 <sup>A</sup>	1,05
c	% / h	10,51 <sup>B</sup>	11,92 <sup>A</sup>	4,96 <sup>C</sup>	0,01
a+b	%	97,80 <sup>Aa</sup>	98,04 <sup>Aa</sup>	96,67 <sup>Ab</sup>	0,84
Degradabilità effettiva (DEPG)					
K=0,02	% / h	91,23 <sup>A</sup>	90,89 <sup>A</sup>	78,26 <sup>B</sup>	1,97
K=0,05	% / h	85,56 <sup>A</sup>	81,03 <sup>A</sup>	61,91 <sup>B</sup>	1,74
K=0,08	% / h	76,83 <sup>Aa</sup>	74,22 <sup>Aa</sup>	53,19 <sup>Ab</sup>	1,59

gradabile) maggiori per il favino M (25,87% vs 18,94 e 15,14% rispettivamente) ed una DESS significativamente più alta con velocità del 5 e dell'8%/h. Questo effetto contrasta con quanto riferito da alcuni Autori per il favino sottoposto ad altri trattamenti termici industriali, ma risulta comunque plausibile, poiché l'amido, presente in quantità piuttosto elevate, essendo particolarmente suscettibile ai trattamenti idrotermici, può aver influenzato positivamente la degradabilità della SS. Inoltre, sebbene con una cinetica piuttosto simile, il favino bagnato si è caratterizzato, rispetto al crudo, per valori superiori della SS potenzialmente degradabile (93,75% vs 90,32%), forse per una più intensa azione batterica. Riguardo la degradabilità ruminale delle proteine, la micronizzazione ha comportato una marcata riduzione della componente rapidamente degradabile (47,29% vs 24,44%), limitando quindi uno squilibrio tra il catabolismo e la neosintesi proteica microbica. In relazione agli altri parametri della cinetica sono state osservate differenze statisticamente significative fra il favino C e quello B, che ha fatto rilevare valori superiori sia di *b* (frazione lentamente degradabile) che di *c* (velocità di degradazione oraria di *b*). Anche la DEPG del favino C e di quello B alle velocità di transito fissate, sono differenti, a fronte di valori minori per il favino micronizzato.

■ **Effect of *Vicia faba minor* treatment on rumen degradability and ANFs**

**Key words:** *Vicia faba minor*, sheep, ANFs, rumen degradability.

**Tabella 1** - Effetto dei trattamenti sul tenore in FAN. Variazioni percentuali negative, riportate tra parentesi, rispetto alla tesi "crudo".

		Crudo	Bagnato	Micronizzato
<b>Polifenoli</b>	% SS	0,786	0,742 (5,60)	0,753 (4,20)
<b>Tannini</b>	% SS	0,724	0,638 (11,88)	0,682 (5,80)
<b>Vicina</b>	% SS	0,522	0,428 (18,01)	0,492 (5,75)
<b>Convicina</b>	% SS	0,271	0,206 (24,02)	0,248 (8,49)
<b>Fitati</b>	% SS	1,295	0,801 (38,15)	0,898 (30,66)
<b>AAT</b>	TUI/mg	3,849	3,214 (16,50)	0,290 (92,47)

## Bibliografia

- Mavrogenis A.P., Hadjipanayiotou M. (1997). A SAS program to estimate effective degradability of animal feeds. Miscellaneous reports 67 (ISSN 0253-6749): 1-6.
- Mc Donald I. (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen, *Journal of Agricultural Science*, 96: 251-252.
- Ørskov E.R., Mc Donald I., (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92: 499-503.
- SAS (2005). Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

# Analisi delle varianti genetiche di beta-caseina in razze ovine italiane



S. CHESSA<sup>1</sup>, D. RIGNANESE<sup>2</sup>, G. CERIOTTI<sup>3</sup>, A. CAROLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IBBA, CNR, Milano

<sup>2</sup> DSBB, Università degli Studi di Brescia

<sup>3</sup> VSA, Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** ovini, beta-caseina, varianti genetiche.

**INTRODUZIONE** - Nel latte ovino è stato osservato un quadro proteico complesso e interessante, tuttavia solo in casi limitati è stato dimostrato il determinismo genetico della variabilità proteica identificata. Recentemente sono stati descritti alcuni SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associati a scambi aminoacidici, ad indicare come la variabilità genetica delle caseine ovine sia stata ancora poco esplorata e meriti ulteriori approfondimenti. Un recente lavoro ha analizzato la variabilità dei quattro loci caseinici ovini nella razza da latte Massese e nelle popolazioni del Centro Italia Garfagnina Pomarancina e Zerasca, riscontrando polimorfismo ai geni *CSN2* ( $\beta$ -caseina) e *CSN1S2* ( $\alpha_{s2}$ -caseina). In particolare per la  $\beta$ -caseina il sequenziamento dei frammenti polimorfici, corrispondenti a parte dell'esone 7, ha permesso di distinguere 4 varianti, indicate come *CSN2\*A*, *CSN2\*G*, *CSN2\*X* e *CSN2\*Y* (Chessa et al., 2010). Il presente lavoro ha lo scopo di fornire ulteriori informazioni circa la diffusione di queste varianti in altre razze ovine e definire l'intera sequenza codificante delle varianti descritte.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati analizzati mediante il protocollo *Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation* (PCR-SSCP) descritto in Chessa et al. (2010) 74 campioni di DNA estratto da sangue di animali dalle seguenti razze: Sarda (SA, n=17), Comisana (CO, n=24), Gentile di Puglia (GP, n=20) e Sopravissana (SV, n=13). Sono stati quindi disegnati i primer per amplificare tutti e 9 gli esoni del gene *CSN2* mediante l'impiego del software Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000). L'elenco delle 7 coppie di primer impiegati è riportato in Tabella 1. Dei 74 campioni analizzati ne sono stati selezionati 8 per il sequenziamento: 2 omozigoti *CSN2\*A*, 2 omozigoti *CSN2\*G*, 2 omozigoti *CSN2\*X* e due eterozigoti *CSN2\*XY* (essendo gli unici campioni disponibili portatori della variante Y). Il sequenziamento è stato effettuato in outsourcing dalla Primm srl (Milano, Italy). Per l'analisi delle sequenze è stato utilizzato il software BioEdit (Hall T. A., 1999).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Tre delle quattro varianti descritte sono diffuse in tutte e quattro le razze, come si può vedere dalla Tabella 2. Per quanto il campione sia di dimensione limitata si può osservare una frequenza molto simile nelle razze con la stessa attitudine, ovvero Sarda e Comisana (principali razze italiane da latte) da una parte e Gentile di Puglia e Sopravissana (razze merinizzate) dall'altra. La variante *CSN2\*Y* precedentemente identificata solo nella popolazione Garfagnina, è stata trovata solo nella razza Comisana e solo allo stato eterozigote.

L'analisi delle sequenze ha messo in luce numerosi polimorfismi sia negli esoni, sia nelle regioni introniche ad essi strettamente adiacenti. In particolare nella variante *CSN2\*X* sono state identificate diverse inserzioni/delezioni, e alcune delle mutazioni che la distinguono dalle varianti *CSN2\*A* e *CSN2\*G* sono le stesse che si riscontrano nel confronto fra la sequenza della specie caprina ed ovina (rispettivamente Acc. Nr. AJ011018 e X79703). È in corso il sequenziamento di altre regioni del gene e di un maggior numero di campioni per validare i polimorfismi riscontrati, dare una definizione corretta delle quattro varianti genetiche osservate e fornire ulteriori indicazioni circa la sua evoluzione. L'analisi di un campione più ampio, facilmente realizzabile in queste razze, e la corretta registrazione dei fenotipi, permetterebbe inoltre di comprendere eventuali associazioni di queste varianti con i caratteri produttivi, fornendo all'allevatore un utile strumento per la selezione degli animali.

Ricerca eseguita con finanziamento Prin 2007XT947K.

**Tabella 1** - Elenco dei primer impiegati per il sequenziamento.

LOCUS	PRIMER	SEQUENZA 5'-3'
Esone 1	Fw	aagaattcatttcctaatcatgcag
	Rv	tgagtggtctgagaaatttgat
Esone 2	Fw	ccatgaggtttgcaggatct
	Rv	tgaccagaggttggtcct
Esoni 3-4	Fw	cagatttgtaaagatagactctgaa
	Rv	tctgctgctgctgctaagtc
Esoni 5-6	Fw	tcattttctgatttcagttgacaaa
	Rv	gccacactgtcacctactg
Esone 7	Fw	tgaccccaaacaatttctaac
	Rv	tgctattttggaaccattca
Esone 8	Fw	atgagcatatgagggcaaaa
	Rv	ggcaattgaaagaaaccaatc
Esone 9	Fw	gcacagcatggtgttttgt
	Rv	atgcctaagggttaattattgaaa

**Tabella 2** - Frequenza dei polimorfismi identificati nei campioni analizzati. SA = Sarda, CO = Comisana, GP = Gentile di Puglia, SV = Sopravissana.

LOCUS	SA	CO	GP	SV
<i>CSN2*A</i>	0,58	0,50	0,71	0,77
<i>CSN2*G</i>	0,18	0,19	0,13	0,14
<i>CSN2*X</i>	0,24	0,27	0,16	0,09
<i>CSN2*Y</i>	–	0,04	–	–

## ■ Analysis of beta-casein genetic variants in italian sheep breeds

**Key words:** ovine, beta-casein, genetic variants.

## Bibliografia

- Chessa S., Rignanese D., Berbenni M., Ceriotti G., Martini M., Pagnacco G., Caroli A. (2010). New genetic polymorphisms within ovine  $\beta$ - and  $\alpha_{s2}$ -caseins. *Small Rumin. Res.* 88: 84-88.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, pp. 95-98.
- Rozen S. and Skaletsky H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

# Resistenza genetica ai lentivirus: studio sulla variabilità del gene *CCR5* nei caprini



S. COLUSSI<sup>1</sup>, M.G. MANIACI<sup>1</sup>, S. PELETTI<sup>1</sup>, T. GIOVANNINI<sup>1</sup>, P. MODESTO<sup>1</sup>, A. QUASSO<sup>2</sup>, P. SACCHI<sup>3</sup>, S. ROSATI<sup>3</sup>, P.L. ACUTIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta - Via Bologna, 148 - 10154 Torino

<sup>2</sup> ASL AT Asti - Dipartimento di Prevenzione - Servizi Veterinari - Area Sanità Animale

<sup>3</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino

**Parole chiave:** lentivirus, gene *CCR5*, caprini, resistenza.

**INTRODUZIONE** - Il virus Maedi Visna (MVV) e il virus dell'Artrite-Encefalite caprina (CAEV) determinano una malattia virale contagiosa tipica di ovini e caprini; appartengono alla famiglia Retroviridae, genere Lentivirus, a cui è ascrivibile anche il virus dell'immunodeficienza acquisita dell'uomo (HIV). I Lentivirus dei piccoli ruminanti causano un'infezione persistente nell'organismo ospite, caratterizzata da un lungo periodo di incubazione, decorso cronico e progressivo. Nell'uomo sono stati descritti alcuni marcatori genetici coinvolti nella modulazione della suscettibilità all'HIV: tra questi il gene *CCR5* codificante per il principale co-recettore per HIV-1 nelle fasi iniziali dell'infezione. In particolar modo è stata descritta una delezione caratteristica di 32 pb presente nella regione codificante, che determina l'incapacità di esprimere un recettore funzionante a livello della membrana cellulare, a cui consegue un'elevata resistenza all'infezione virale; inoltre mutazioni a carico delle regioni regolatrici sono state associate sia ad un differente livello di espressione del recettore, sia ad una differente suscettibilità verso il virus<sup>1</sup>.

Un recente studio condotto sugli ovini ha messo in evidenza una delezione di 4 pb nella regione del promotore di *CCR5* che determina un'alterazione dei siti di legame per fattori trascrizionali riducendo, in ovini omozigoti deleti, fino a 3.9 volte l'espressione di tale recettore e dimezzando la carica provirale<sup>2</sup>.

Partendo da tale contesto si è deciso di effettuare uno studio conoscitivo sul gene *CCR5* caprino, non ancora descritto, a cui seguirà uno studio caso-controllo su animali provenienti da focolaio in modo da poter verificare se taluni dei polimorfismi rilevati sono coinvolti nel conferire resistenza/suscettibilità al CAEV.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati analizzati 20 campioni di sangue appartenenti a caprini di razza Camosciata. Gli animali sono stati scelti di differente età, non imparentati tra loro e con una ratio tra i sessi di 1:1. Il DNA è stato estratto manualmente mediante il kit Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Il gene *CCR5*, analogamente a quanto fatto per gli ovini, è stato analizzato mediante quattro PCR comprendenti la regione del promotore, Esone 1, Introne, Esone 2 e CDS, regione 3' UTR, utilizzando i primer riportati in Tabella 1.

La PCR è stata condotta su un volume di reazione pari a 50 µl mediante utilizzo di Platinum® qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) 25 µl, con aggiunta dei primer suddetti [300 nM] ed utilizzando il profilo termico proposto da White (2009).

Ciascun amplificato è stato sottoposto a sequenziamento utilizzando i primer descritti da White (2009) e la chimica BigDye 3.1 (Applied Bio-

**Tabella 2** - Mutazioni del gene *CCR5* rilevate nei caprini.

Mutazione	Allele minore	Frequenza (%)
4421 Ins TC	Ins	0.025
4463 G>A	A	0.150
4788 C>G	G	0.125
5171 C>A	A	0.150
5305 C>T	T	0.175
5637 C>T	T	0.150
6415 T>C	C	0.150
7266 T>C	C	0.025
7412 T>C	C	0.025
7448 T>C	C	0.150
8121 T>C	C	0.125
8598 C>T	T	0.150
9161 C>T	T	0.125
9332 G>C	C	0.025
9353 G>C	C	0.025

systems). Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante il Software SeqMan (Lasergene).

**RISULTATI** - Sono state riscontrate le mutazioni riportate in Tabella 2; come numerazione di riferimento è stata utilizzata la numerazione della sequenza del gene *CCR5* ovino (GenBank FJ008056.1). Tutti i marker rilevati, tranne uno (Ins 4421), sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ ). Al momento è in corso l'analisi bioinformatica dei polimorfismi presenti in regioni regolatrici che potrebbero alterare siti di interazione con fattori di trascrizione. L'allineamento multiplo non ha mostrato mutazioni analoghe a quelle riscontrate nell'ovino tra cui la delezione nella regione del promotore (5436-5439) associata ad una riduzione della carica provirale.

**CONSIDERAZIONI** - Questo lavoro indaga per la prima volta la sequenza del gene *CCR5* nella capra ed i polimorfismi ad esso associati. Tra i polimorfismi riscontrati alcuni di essi verranno selezionati in base al possibile impatto sull'espressione e funzionalità del recettore *CCR5*. Per questi marker verranno messe a punto tecniche di screening rapido, quali il pirosequenziamento, da applicare a casi e controlli provenienti dal focolaio.

**Tabella 1** - Primer di PCR.

Sequenza dei primers	Regione di interesse ( <i>Ovis aries</i> FJ008056.1)
5'-tgtagcaccagccattagcttc-3'	4104-4125
5'-cctgtttgtatcttgatgttat-3'	5963-5986
5'-tcagggaacccatgaataa-3'	5529-5548
5'-ctgcagtgaatgaagctgtga-3'	7039-7059
5'-cagcaagctcctaataatgc-3'	6936-6955
5'-tactcgctctggagactctc-3'	8514-8533
5'-tggctatcgccatgctgtg-3'	7911-7930
5'-tcccactctggctcaact-3'	9436-9455

■ Genetic resistance to lentivirus: a study on the variability of the caprine *CCR5* gene

**Key words:** lentivirus, *CCR5* gene, goats, resistance.

## Bibliografia

- Kaslow R.A., Dorak T. & Tang J.J. (2005). Journal of Infectious Diseases 191:568-77.
- White S.N., Mousel M.R., Reynolds J.O., Lewis G.S., Herrmann-Hoesing L.M. (2008). Animal Genetics 40(5):583-9. Epub 2009 Apr 20.

# Proteolisi e lipolisi in formaggi ottenuti da latte di pecore Massesi o Garfagnine



G. CONTE<sup>1</sup>, L. CASAROSA<sup>1</sup>, P. POLI<sup>1</sup>, A. SERRA<sup>1</sup>, G. FORMISANO<sup>1</sup>, M. MELE<sup>1</sup>, D. CERRI<sup>2</sup>, P. SECCHIARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema - Università di Pisa, Via San Michele degli Scalzi, 2 - 56100 Pisa

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti - Università di Pisa, Viale delle Piagge, 2 - 56100 Pisa

**Parole chiave:** pecorino, starter autoctono, lipolisi, proteolisi.

**INTRODUZIONE** - Le caratteristiche qualitative sono importanti nel definire la tipicità di un prodotto in un determinato territorio. Il formaggio pecorino della Garfagnana (un territorio ubicato nella parte nord-occidentale della Toscana, in provincia di Lucca) viene prodotto secondo le tecniche tradizionali, che molto spesso differiscono da un produttore all'altro. La conseguenza di questi diversi tipi di produzione è la notevole disformità tra i prodotti disponibili per i consumatori che devono scegliere tra pecorini simili per denominazione, ma diversi per le caratteristiche organolettiche. Per valorizzare il territorio, nasce l'esigenza di definire la produzione di un formaggio pecorino che sia rappresentativo della zona di origine. In questo lavoro sono stati valutati alcuni aspetti del processo di caseificazione che definiscono le caratteristiche chimico tecnologiche del pecorino Garfagnino prodotto utilizzando uno starter di batteri lattici autoctoni.

**MATERIALI E METODI** - I formaggi sono stati prodotti in un caseificio privato della Garfagnana. Per la caseificazione sono state utilizzate due tipologie di starter, uno comunemente presente in commercio (SC) ed un altro autoctono (SA) allestito dal dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti dell'Università di Pisa. I formaggi ottenuti sono stati prodotti con latte monorazza di Garfagnina e Massese ai quali sono stati aggiunti i due tipi di starter, costituendo così 4 tesi: formaggio da latte di Garfagnina con starter commerciale (SCg) e autoctono (SAg) e formaggio da latte di Massese con starter commerciale (SCm) e autoctono (SAm). I formaggi sono stati campionati a 0, 14 e 60 giorni di stagionatura per monitorare il processo di maturazione delle quattro tipologie di formaggio. A tal fine è stato valutato il livello di proteolisi e di lipolisi, che rappresentano due processi importanti nella definizione delle caratteristiche organolettiche del prodotto. Nel primo caso è stato preso in considerazione il livello di azoto solubile in acqua (WSN) come riportato da Park e Jin (1998), in quanto all'aumentare della proteolisi aumenta anche tale parametro. La lipolisi è stata determinata misurando il livello di acidi grassi liberi espresso come g di acido oleico libero su 100 g di formaggio. Inoltre è stata determinata la composizione degli acidi grassi mediante gas-cromatografia con il metodo proposto da Mele et al. (2007). L'estrazione della frazione lipidica è stata fatta con il protocollo di de Jong e Badings (1990).

**RISULTATI** - I risultati ottenuti hanno dimostrato che la maturazione dei formaggi si modifica sensibilmente al variare dei fattori che concorrono nel processo di caseificazione. In particolare l'utilizzo di SA ha determinato un livello di proteolisi e di lipolisi superiore a quello di SC, +14% e +38% rispettivamente. I Grafici 1 e 2 confermano il maggior livello lipolitico e proteolitico del formaggio caseificato con SA sia utilizzando il latte di Massese che quello di Garfagnina. Il contenuto degli acidi grassi esterificati si è ridotto significativamente durante la fase di maturazione. Infatti i formaggi a due mesi dalla caseificazione presentavano valori più bassi rispetto a quelli a zero giorni, mentre a 14 giorni è stata notata una composizione intermedia. Questo risultato è in accordo con il crescente livello lipolitico già commentato con l'analisi dell'acidità libera.

**CONSIDERAZIONI** - L'utilizzo di starter differenti ha portato alla produzione di formaggi con diverse caratteristiche di maturazione. In particolare ogni starter determina una maturazione caratteristica che permetterà di definire un determinato prodotto che sia rappresentativo di una determinata regione, a prescindere dalla razza utilizzata per la produzione di latte.

■ Proteolysis and lipolysis in cheese from Massese or Garfagnina ewes

**Key words:** pecorino, autochthonous starter, lipolysis, proteolysis.

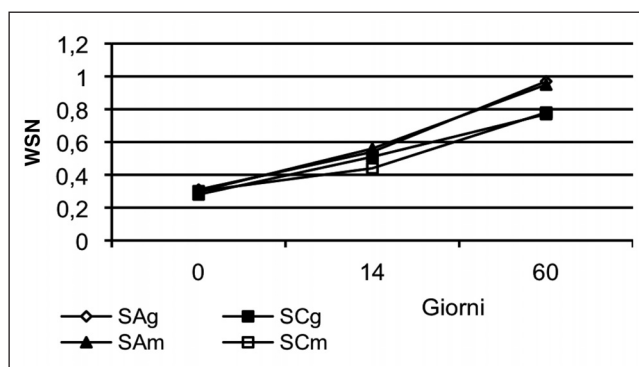


Grafico 1 - Andamento del WSN durante la stagionatura.

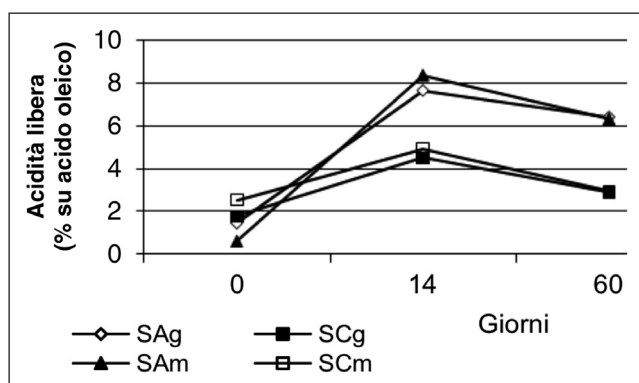


Grafico 2 - Andamento dell'acidità libera durante la stagionatura.

**Tabella 1** - Composizione degli acidi grassi durante la stagionatura (g/100 g lipidi totali). A, B, C per  $p < 0.01$ . Legenda: SFA (acidi grassi saturi); MUFA (acidi grassi monoinsaturi); PUFA (acidi grassi polinsaturi).

	Giorni			ES	P<F
	0	14	60		
SFA	67.02 B	66.21 A	62.26 A	1.16	0.02
MUFA	22.54 C	20.90 B	19.37 A	0.48	< 0.01
PUFA	5.43 B	4.99 A	4.76 A	0.11	< 0.01
Totale	95.09 C	92.10 B	86.39 A	1.75	<0.01

## Bibliografia

- de Jong C., Badings H.T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese. *J. High Res. Chrom.* 13: 94-98.
- Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Macciotta N.P.P., Serra A., Buccioni A., Pagnacco G., Secchiari P. (2007). Stearoyl CoA Desaturase gene polymorphism and milk fatty acids composition in Italian Holstein. *J. Dairy Sci.* 90: 4458-4465.
- Park Y.W., Jin Y.K. (1998). Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. *Small Ruminant Research*, 28: 263-272.



# La capra autoctona della Garfagnana: valutazione morfofunzionale e sanitaria



F. CORRIAS<sup>1</sup>, F. SALARI<sup>5</sup>, A. DAL PRA<sup>1</sup>, G. RAGONA<sup>1</sup>, A. LOMBARDO<sup>1</sup>, M. MARI<sup>1</sup>, I. ALTOMONTE<sup>5</sup>, G. COLOMBANI<sup>2</sup>, P. PEDRI<sup>3</sup>, B. SCOTTI<sup>4</sup>, G. BRAJON<sup>1</sup>, M. MARTINI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>I.Z.S. L.T. Sez. Firenze, Via di Castelpulci 50 Loc. San Martino alla Palma, Scandicci 50010 FI

<sup>2</sup>A.S.L. 2 Lucca, Via per S. Alessio, Monte San Quirico, 55100 LU

<sup>3</sup>A.S.L. 1 Massa e Carrara, Via Don Minzoni, 3, Carrara 54033 MS

<sup>4</sup>A.S.L. 12 Viareggio, Via Aurelia 335, Lido di Camaione, 55041 LU

<sup>5</sup>D.P.A., Università Pisa, Viale delle Piagge 2, 56124 PI

**Parole chiave:** capra Garfagnina, stato sanitario, allevamento, produzioni.

**INTRODUZIONE** - La capra Garfagnina costituisce una popolazione di circa 2500 capi, diffusa nell'area nord-occidentale della Toscana. Nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzato alla caratterizzazione e valorizzazione di questo ecotipo, è stato realizzato uno studio volto alla valutazione delle principali caratteristiche morfologiche, produttive e sanitarie.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine, svolta nel periodo ottobre 2007-maggio 2008, ha interessato 31 allevamenti distribuiti tra le province di Lucca (18), Massa Carrara (12) e Pistoia (1) georeferenziati. Su un campione rappresentativo di capi (N=320) stratificati per consistenza aziendale (WINEPISCOPE 2.0) sono state effettuate: 1) anamnesi dello stato sanitario con intervista agli allevatori e compilazione di apposite schede; 2) campioni di emosieri per accertamenti sanitari nei riguardi di Brucellosi, Tularemia, virus dell'Artrite-encefalite caprina (CAEV), Paratubercolosi; 3) campioni fecali di massa e individuali per ricerca di enteroparassiti; 4) campioni di latte di massa aziendale.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - L'allevamento è a gestione familiare, semi-estensivo con transumanza verticale nel 30% delle aziende; le stalle sono per lo più sprovviste di sala di mungitura e tank refrigeranti. Il latte è quasi sempre trasformato in azienda ed i formaggi venduti localmente. Le capre partoriscono una volta l'anno (gemellarità 40%) ed il capretto è macellato a circa 2 mesi di età. L'alimentazione è basata sul pascolo e prevede integrazioni con fieno e piccole quantità di concentrati nel periodo invernale. Gli animali sono omogenei per conformazione ma presentano variabilità fenotipica. La produzione di latte è di circa 2 litri /capo/die e la qualità chimica standard rientra nel range di specie<sup>1</sup> con bassi contenuti di cellule somatiche (CCS) e carica batterica totale (CBT)<sup>2</sup>. Non sono state segnalate mortalità o casi di aborto anomali. Si ricorre alla vaccinazione per clostridiosi ed annualmente sono effettuati interventi diselmintizzanti. Frequentemente sono stati riscontrati ectoparassiti (*Ixodes spp.*) senza però evidenziare lesioni cutanee o manifestazioni pruriginose.

Tra gli enteroparassiti sono presenti strongili gastro-intestinali (100%) e coccidi (30%), ma il loro numero è sempre inferiore a 100 upg (uovo/oocisti per grammo). Il *fecal score* favorevole<sup>3</sup> non ha fatto sospettare presenza di disordini alimentari o enteropatie. Gli esami sierologici sono risultati sempre negativi per brucellosi e variamente positivi per CAEV e Paratubercolosi. La sieropositività per Tularemia è conferma di un problema sanitario nel territorio come risulta evidente da focolai registrati nell'uomo in provincia di Pistoia. I risultati dei parametri produttivi hanno evidenziato la buona opportunità per valorizzare i pro-

**Tabella 2** - Parametri morfologici delle femmine e maschi adulti.

cm	Femmine		Maschi	
	Media	DS	Media	DS
Altezza Garrese	75,60	3,851	83,50	4,579
Altezza torace	31,99	2,480	36,72	4,675
Profondità torace	40,77	3,604	47,17	3,434
Lunghezza tronco	79,74	5,433	88,67	7,806
Larghezza groppa	17,94	1,478	18,83	2,065
Circonferenza torace	93,05	6,065	101,00	9,048
Circonferenza stinco	10,00	0,951	11,71	1,404

**Tabella 3** - Caratteristiche chimico fisiche ed igienico sanitarie del latte caprino in esame.

	Media	DS
Sostanza secca (%)	12,43	1,279
Grasso (%)	3,97	0,987
Proteine (%)	3,32	0,371
Caseina (%)	2,80	0,303
Lattosio (%)	4,38	0,140
Ceneri (%)	0,78	0,045
Ca (%)	0,18	0,024
P (%)	0,12	0,016
Punto crioscopico (°C)	-0,537	0,008
CBT (ufc*1000)/ml	183,55	307,98
CCS (cell*1000)/ml	772,42	607,054
Urea (mg/dl)	33,43	2,370

dotti in ambito di filiera corta, a tal fine bisogna garantire la sicurezza igienico sanitaria con particolare riguardo alle due patologie riscontrate (CAEV e Paratubercolosi) per le quali possono essere avviati piani mirati di controllo ed eradicazione.

Lavoro eseguito con finanziamenti Arsia 2007, Prin 2007.

## ■ Morphofunctional and healthy characterization in Garfagnina native goat

**Key words:** Garfagnina goats, health, farm management, productions.

## Bibliografia

- Guo, M., Y.W. Park, P.H. Dixon, J.A. Gilmore, and P.S. Kindstedt. 2004. Small Rumin. Res.; 52: 103-107.
- Delgado- Pertin es, M., M.J. Alcade, J.L. Guzmàn-Guerrero, J.M. Castel, Y. Mena, and F. Caravaca. 2003. Small Rumin. Res.; 47: 51-61.
- Zaaijer D., Kremer J.P.T., Noordhuizen M. Cow Signals.

**Tabella 1** - Accertamenti sanitari su 320 capi.

Malattia	Prevalenza %	IC 95%	
		Minimo	Massimo
CAEV	6,58	4,09	9,07
Paratubercolosi	5,26	3,02	7,05
Tularemia	0,526	-0,20	1,25
Brucellosi	0	0	0
Strongili GI	100	100	100
Eimeria spp.	29,73	25,13	34,33



# Il Centro Regionale per il Monitoraggio delle Parassitosi: un centro a servizio dell'allevamento ovino e caprino in Campania



G. CRINGOLI<sup>1</sup>, L. RINALDI<sup>1</sup>, M. SANTANIELLO<sup>1</sup>, I. GUARIGLIA<sup>1</sup>, S. CARBONE<sup>1</sup>, M.E. MORGOGLIONE<sup>1</sup>, S. PENNACCHIO<sup>1</sup>, A. BOSCO<sup>1</sup>, G. CAPPELLI<sup>1</sup>, V. MUSELLA<sup>2</sup>, A. SANTANIELLO<sup>1</sup>, M.P. MAURELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Campania, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catanzaro, Italia

**Parole chiave:** ovini, caprini, parassiti, diagnosi, CREMOPAR.

Il Centro Regionale per il Monitoraggio delle Parassitosi (CREMOPAR) è un Centro di Ricerca, sito in Località Borgo Cioffi, Eboli (SA), istituito con deliberazione di G.R. n° 5147 nel 2000 e regolamentato da una convenzione tra il Settore SIRCA dell'Assessorato alla Agricoltura della Regione Campania ed il Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II.

Il Centro è dotato di Laboratori di protozoologia, elmintologia ed entomologia; studi ed uffici per elaborazione dati, amministrazione, gestione e management; centro congressi, con 120 posti, per convegni, workshop, simposi ed eventi formativi e divulgativi, organizzati dal CREMOPAR, Università ed altri Enti; sala anatomica per attività diagnostica, didattica e corsi di formazione per tecnici ed operatori del settore, organizzati da CREMOPAR, Università ed altri Enti. È presente inoltre una Foresteria per personale CREMOPAR, studenti e ricercatori italiani e stranieri, nonché una foresteria studenti con 20 posti letto. Notevoli sono le attività di Ricerca del CREMOPAR, soprattutto a carattere epidemiologico, finalizzate alla conoscenza della realtà parassitologica territoriale e realizzate con l'ausilio delle più potenti e moderne risorse messe a disposizione dai Sistemi Informativi Geografici (Geographical Information System - GIS).

Il Centro svolge principalmente attività diagnostica gratuita, rivolta ad allevamenti ovini, caprini, bovini e bufalini, per il miglioramento delle capacità produttive e del benessere degli animali da reddito in Campania.

Le attività di monitoraggio svolte dal CREMOPAR hanno evidenziato la presenza e la diffusione di numerosi parassiti negli allevamenti ovini e caprini della Regione Campania, il che rappresenta il fattore primario che incide negativamente sulle produzioni del comparto, con perdite economiche complessive che vanno ben oltre il 30% del prodotto lordo vendibile.

Un allevamento ovino o caprino al pascolo senza parassiti non esiste. La norma è di trovare in uno stesso allevamento e spesso in uno stesso animale, diverse specie di parassiti contemporaneamente presenti. I protozoi sono i più diffusi: tra questi, *Toxoplasma gondii* si rinviene con estrema frequenza negli ovini, mentre i coccidi del genere *Eimeria* sono presenti nella totalità degli allevamenti sia ovini che caprini. Diffusissimi sono anche i nematodi a localizzazione gastrointestinale che parassitano la quasi totalità degli allevamenti; i generi più diffusi nei piccoli ruminanti domestici allevati in Campania sono *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum*, *Chabertia* e *Bunostomum*, alcuni dei quali agenti di zoonosi. Notevolmente presenti sono anche i nematodi a localizzazione broncopulmonare, i trematodi *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica* e *Calicophoron daubneyi*, nonché i cestodi del genere *Moniezia*.

La presenza contemporanea di più generi e/o specie differenti di elminti, nella maggior parte dei casi è all'origine di un'azione infiammatoria/traumatica e di sottrazione dei principi nutritivi che si riflette negativamente sull'accrescimento, sulla fecondità e più in generale sulla capacità produttiva degli animali (Hoste et al., 2006; Rinaldi et al., 2007). I danni arrecati da questi parassiti sono ben conosciuti tra gli addetti ai lavori che richiedono spesso adeguati interventi profilattico-terapeutici per contrastare i loro effetti negativi (Scala, 2006).

Negli ultimi anni sono stati proposti diversi indicatori fisiopatologici per la diagnosi delle parassitosi ed in particolare degli strongili gastrointestinali; tuttavia, a tutt'oggi la Faecal Egg Count (FEC) rimane l'approccio diagnostico più largamente utilizzato (Cringoli et al., 2004; Villanua et al., 2006).

Presso i laboratori del Settore di Parassitologia del Dipartimento di Patologia e Sanità Animale e del CREMOPAR sono state messe a punto nuove tecniche FEC multivalenti (che permettono di effettuare con una sola analisi la diagnosi di almeno 18 elementi parassitari nei piccoli ruminanti), le tecniche FLOTAC (Cringoli, 2006; Cringoli et al., 2010). Queste tecniche consentono la conta diretta degli elementi parassitari (uova, larve, oocisti e cisti) presenti in un grammo di feci; la sensibilità analitica della tecnica base è di 1 uovo/larva/(oo)cisti per grammo di feci (UPG/LPG/OPG/CPG), ovvero l'unità internazionale di misura della FEC. Come già riportato in Cringoli et al. (2010), per la loro sensibilità, affidabilità, precisione ed accuratezza, le tecniche FLOTAC sono buone candidate per una FEC standardizzata nei piccoli ruminanti così come in altre specie animali, nonché nell'uomo.

■ The Regional Center for Monitoring Parasitic infections: a service for sheep and goat farms in the Campania region

**Key words:** sheep, goats, diagnosis, CREMOPAR.

## Bibliografia

- Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S.M., Hoskin S.O., 2006. Trends Parasitol., 22(6):253-61.
- Scala A., 2006. Parassitologia, 48(3):403-8.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A., 2004. Vet. Parasitol., 123(1-2):121-31.
- Cringoli G., 2006. Parassitologia, 48(3):381-4.
- Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J., 2010. Nat. Protoc., 5(3):503-15.
- Rinaldi L., Veneziano V., Cringoli G., 2007. Trans R Soc Trop Med Hyg, 101(8):745-6.
- Villanua D., Pérez-Rodríguez L., Gortázar C., Höfle U., Viñuela J., 2006. Parasitology, 133(Pt 2):251-9.

# Effetto di polimorfismi in geni candidati sulle caratteristiche qualitative del latte ovino



M. D'ANDREA<sup>1</sup>, M. MELE<sup>2</sup>, C. DIMAURO<sup>3</sup>, F. PILLA<sup>1</sup>, P. FRESI<sup>4</sup>,  
C. BRACCIAFERRI<sup>4</sup>, N.P.P. MACCIOTTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise

<sup>2</sup> Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema, Università degli Studi di Pisa

<sup>3</sup> Dipartimento Scienze Zootechniche, Università degli Studi di Sassari

<sup>4</sup> Associazione Nazionale della Pastorizia

**Parole chiave:** miglioramento genetico, ovini da latte, acidi grassi del latte.

**INTRODUZIONE** - La valutazione dei riproduttori negli ovini viene attualmente svolta attraverso i classici metodi di stima del valore genetico utilizzando le informazioni relative ai fenotipi ed ai rapporti di parentela.

Dato il sistema di allevamento, la difficoltà ed il costo dei controlli funzionali e la scarsa efficienza della inseminazione strumentale non in tutte razze viene praticato il miglioramento genetico ed in ogni caso per il latte vengono valutati soltanto gli aspetti quantitativi della produzione (Carta et al. 2009). Tuttavia risultano di particolare interesse per il latte ovino gli aspetti nutraceutici con particolare riguardo al contenuto dei diversi acidi grassi per i quali è stata recentemente dimostrata l'esistenza di un determinismo genetico. L'individuazione dei geni responsabili delle caratteristiche quanti-qualitative del latte ovino permetterebbe quindi di aumentare l'efficienza del miglioramento genetico e di considerare nuovi obiettivi di selezione quali le caratteristiche nutrizionali e funzionali del latte. Una valida strategia per identificare i geni responsabili di un carattere è quella di verificare le associazioni tra polimorfismi di geni candidati (presumibilmente coinvolti nel carattere in base alla loro funzione o ad analogie con altre specie) e livelli diversi di espressione fenotipica. Per quanto riguarda la qualità del latte due geni: Delta 9 desaturasi (SCD) e il diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) sono già risultati influenzare le caratteristiche della produzione di latte nei bovini (Mele et al. 2007) e negli ovini (Scatà et al. 2009). Lo scopo del lavoro è stato quello di associare polimorfismi dei geni codificanti per l'SCD e DAGT1 alle caratteristiche qualitative e quantitative del latte ovino.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su 99 pecore (secondipare), 29 di razza Massese e 70 di razza Comisana, allevate presso il centro genetico di Asciano dell'ASSONAPA. Il latte è stato prelevato lo stesso giorno per tutte le pecore della stessa razza ed il profilo acido del grasso è stato determinato su campioni individuali mediante gascromatografia (Mele et al. 2007). Per questi soggetti si disponeva dei dati dei controlli funzionali (quantità di latte e contenuto di grasso e proteine). Per individuare nuovi polimorfismi del gene SCD il DNA genomico è stato estratto da 14 individui di razze diverse ed il gene SCD sequenziato. In questo modo sono individuati 5 nuovi polimorfismi di tipo SNP (single nucleotide polymorphism). Per tutti gli animali è stato determinato il genotipo di 7 polimorfismi nel gene SCD e di 2 nel gene DAGT1 (Scatà et al. 2009). Lo studio di associazione fra polimorfismi ai geni ed il profilo acido del latte ed i dati dei controlli funzionali è stato condotto con un modello lineare che includeva come effetti fissi la razza, la fase di lattazione in cui era stato prelevato il campione di latte (2 stadi: <80 giorni o >80 giorni dal parto, rispettivamente) ed il genotipo allo SNP considerato; nell'elaborazione dei dati produttivi sono stati inclusi l'effetto fisso dell'ordine di parto e quello casuale dell'animale. L'analisi è stata condotta sui 5 SNP risultati polimorfici nel campione di animali considerato (3 nel gene SCD e

**Tabella 1**

Carattere	Significatività SNP	Genotipo		
		SNP5: gene scd		
		AA	CA	CC
C18-1c9	0.05	16,87 <sup>A</sup> ± 0,20	15,59 <sup>B</sup> ± 0,38	16,37 <sup>AB</sup> ± 0,82
SFA	0.0007	55,24 <sup>Aa</sup> ± 0.29	57,14 <sup>B</sup> ± 0.54	58,38 <sup>ABb</sup> ± 1,15
C6	0.07	1.84 <sup>a</sup> ± 0.05	2.10 <sup>b</sup> ± 0.09	1.99 <sup>ab</sup> ± 0,20
% Proteina*	0,06	5,77 ± 0,035	5.92 ± 0,060	5,85 ± 0,12
		SNP7: gene scd		
		CC	TC	TT
% Proteina	0,026	5,76 <sup>A</sup> ± 0,036	5,95 <sup>B</sup> ± 0,064	5,85 <sup>AB</sup> ± 0,169

\* Solo razza Comisana - A, B, C = medie sulla riga statisticamente differenti (P<0.01) - a, b, c = medie sulla riga statisticamente differenti (P<0.05).

2 nel DAGT1). Per tenere conto della limitata numerosità del campione e del possibile effetto dei confronti multipli, la significatività statistica dell'effetto medio dello SNP nell'analisi dei dati dello spettro acido è stata corretta secondo la procedura di Bonferroni, mentre per i caratteri produttivi la varianza animale è stata considerata come denominatore del test F.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nella Tabella 1 sono riportati i caratteri per cui è stato trovato un effetto significativo. Dalla tabella si evince un effetto del gene SCD sulla percentuale di acido oleico e conseguentemente sul contenuto di saturi, inoltre un effetto è stato riscontrato anche sulla percentuale in proteina. Anche i polimorfismi del gene DGAT1 sono risultati associati con acidi grassi (C11, C15, C18:1 cis 11, C18:1 cis 13) meno rilevanti sia come quantità che come effetti nutrizionali. I risultati, ancorché preliminari, ma particolarmente interessanti perché ottenuti in un nucleo di selezione con un limitato effetto della diversità ambientale, indicano l'esistenza di un effetto del gene SCD sulla qualità fine del latte ovino e suggeriscono la possibilità di una selezione per questo carattere.

## ■ Influence of polymorphisms in candidate genes on milk sheep quality traits

**Key words:** genetic improvement, dairy sheep, milk fatty acids.

## Bibliografia

- Carta A., Casu S., Salaris S. (2009) Current state of genetic improvement in dairy sheep J.Dairy Sci. 92:5814-5833.
- Scatà M.C., Napolitano F., Casu S., Carta A., De Matteis G., Signorelli F., Annicchiarico G., Catillo G., Moio B. (2009) Ovine acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1-molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. Anim. Genet. 40:737-742.
- Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Macchiotta N.P., Serra A., Bucconi A., Pagnacco G., Secchiari P. (2007) Stearoyl-coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. J. Dairy Sci. 90:4458-4465.

# Sieroprevalenza dell'idatidosi in greggi monticanti in provincia di Torino



S. DALMASSO, L. RAMBOZZI, A.R. MOLINAR MIN, L. ROSSI

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino  
Via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO)

**Parole chiave:** *Echinococcus granulosus*, ovini, immunoblotting.

**INTRODUZIONE** - Il processo di ricolonizzazione naturale delle Alpi occidentali da parte del lupo (*Canis lupus*) ha rappresentato - oltre che un traguardo per la conservazione della specie - una nuova difficoltà per gli allevatori che monticano nei mesi estivi nelle vallate alpine. Per questo motivo, a partire dal 1999, la Regione Piemonte ha previsto, tra le varie azioni finalizzate alla conservazione della specie e ad una coesistenza stabile tra lupo e attività economiche, un sistema di monitoraggio, prevenzione e risarcimento dei danni da canide. Le necroscopie di ovicaprini predati da canidi, effettuate dal medico veterinario incaricato degli accertamenti, hanno rivelato con una certa regolarità idatidi a livello epatico e/o polmonare, quasi tutte vitali. Indagini biomolecolari hanno permesso di attribuire l'infestazione al ceppo G1 di *E. granulosus*, il principale responsabile di patologia nell'uomo (Eckert et al., 2000; Dinkel et al., 2004).

*Echinococcus granulosus* è un parassita diffuso nell'Italia peninsulare, ma assai più raro nel Nord Italia. In Piemonte i dati ufficiali raccolti in sede di macellazione indicano una presenza di idatidosi ovicaprina inferiore allo 0,8% (<http://www.regione.piemonte.it/sanita/sanpub/vigilanza/dwd/relaz09/ispettivo.pdf>).

Tali dati potrebbero non descrivere in modo attendibile la situazione epidemiologica delle greggi monticanti; nel 2007-8 solo il 15% circa degli ovini macellati erano animali adulti, quelli con più alta possibilità di albergare il parassita.

Obiettivo del presente studio è stato quello di indagare la prevalenza di echinococcosi cistica (CE) in ovini monticanti in un areale diffusamente popolato da ungulati selvatici e in cui il ritorno del lupo potrebbe creare i presupposti per l'instaurarsi di un ciclo silvestre della parassitosi.

**MATERIALI E METODI** - L'area di studio, di circa 180000 ha, comprende le valli Pellice, Germanasca, Chisone e Susa (Figura 1). Il territorio è costituito da vallate alpine, circondate da vette alte dai 700 ai 3538 m. Il periodo di monticazione va da maggio ad ottobre, anche se la permanenza negli alpeggi più alti è limitata al periodo da luglio a settembre.

L'indagine sierologica è stata condotta su 1217 ovini provenienti da 9 greggi che monticano nell'area di studio. I sieri sono stati analizzati mediante un test EITB (enzyme-linked immunoelectrotransfer blot) descritto da Dueger et al. (2003) che utilizza come antigene il liquido idatideo. I campioni sono stati processati a pool (20 sieri a pool) e, in caso di positività, testati individualmente.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Sono stati analizzati 63 pool: 44 sono risultati negativi, 19 hanno dato esito positivo e sono quindi stati ritestati individualmente. Sette dei 9 greggi testati (77,8%) sono risultati positivi, con prevalenze tra il 4,4 ed il 46%. La sieroprevalenza riscontrata nei 1217 capi è stata pari al 10,8% (IC 95%: 9,3%-12,4%). Tenendo conto dei limiti di sensibilità (74,2%) e specificità (93,3%) del test, e delle dimensioni del campione, è stato possibile stimare una prevalenza "reale" del 6,1% (I.C. 95%: 0,7%-11,5%). I risultati ottenuti dimostrano come l'echinococcosi/idatidosi sia endemica nell'areale di studio, dove - peraltro - sussistono le condizioni ideali per il suo man-

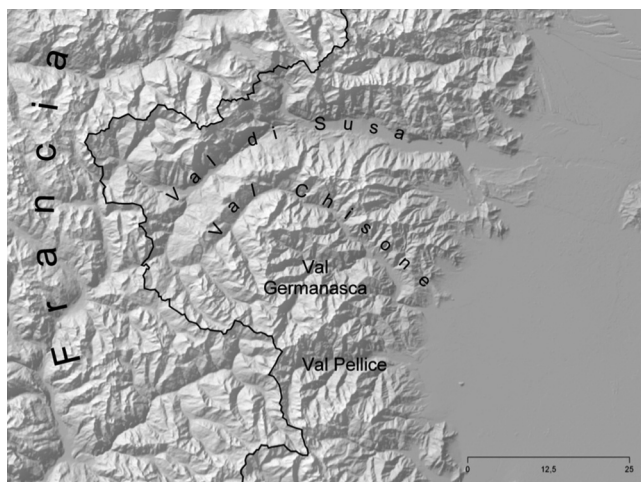


Figura 1 - Area di studio (tra 45°10'N, 6°37'E e 44°43'N, 7°20'E).

tenimento. Esse derivano dal carattere tipicamente estensivo dell'ovicoltura, secondo la tipologia di conduzione denominata "pascolo vagante" (Verona, 2006), nella quale grandi greggi ovini (a volte migliaia di capi) sono alimentati esclusivamente a pascolo. I cani da conduzione e da guardiania presenti costantemente ed in gran numero sui pascoli possono accedere con facilità alle carcasse degli ovini morti spontaneamente (circa il 3%, durante una normale stagione d'alpeggio). Inoltre, la scarsa o assente consapevolezza dei rischi legati all'echinococcosi, ancora oggi fa sì che i visceri di soggetti macellati impropriamente possano essere destinati all'alimentazione di questi cani.

I risultati dello studio suggeriscono che i dati ufficiali possono non essere pienamente rappresentativi delle realtà locali.

## Serological investigation of ovine hydatidosis in North-Western Italy

**Key words:** *Echinococcus granulosus*, ovine, immunoblotting.

## Bibliografia

- Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A., Wälz M., Zeyhle E., Elmahdi I.E., Mackenstedt U., Romig T. (2004). International Journal for Parasitology; 34(5):645-53.  
Dueger E.L., Verastegui M., Gilman R.H. (2003). Veterinary Parasitology; 25; 114(4):285-93.  
Eckert J., Conraths F.J., Tackmann K. (2000). International Journal for Parasitology; 30(12-13):1283-94.  
Verona, M. (2006). Quaderni di cultura alpina, 84-85:252.

# Inseminazione artificiale in un allevamento biologico ovino



M. DATTENA, I. MAYORGA, L. MARA, M. GALLUS, G. MELONI, A. LAI, A. CABIDDU, S. SALARIS

AGRIS Sardegna (DIRPA), 07100 Sassari, Italia

**Parole chiave:** effetto ariete, sincronizzazione estri.

**INTRODUZIONE** - L'inseminazione artificiale (IA) è alla base del miglioramento genetico di molte specie domestiche. Negli ovini un programma di IA necessita di un trattamento di sincronizzazione del ciclo ovarico con progesterone e PMSG per permettere l'inseminazione a 55h dall'asportazione della spugna senza dover rilevare le manifestazioni estrali peraltro poco apparenti nelle pecore. L'impiego di trattamenti ormonali risulta precluso alle aziende che orientano la loro produzione verso prodotti di qualità come ad esempio quelli biologici. Gli allevatori di tali aziende, perciò, si trovano nell'impossibilità di poter partecipare a programmi di miglioramento genetico. L'obiettivo di questo lavoro è di valutare l'applicazione della IA in un'azienda biologica senza far uso di ormoni.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto in un'azienda nell'agro di Sassari (40°44'6" N) nelle campagne di riproduzione dal 2008 al 2010. Il programma ha previsto: l'utilizzo dell'effetto maschio per indurre la sincronizzazione dei calori, il controllo dei calori 4 volte al giorno e l'inseminazione artificiale 24h dopo l'inizio dell'estro. Ad ogni campagna di riproduzione 60 pecore di Razza Sarda, partorite entro la fine di Novembre dell'anno precedente, sono state isolate dal maschio alla fine del mese di Marzo per un periodo di 6 settimane. L'alimentazione del gregge in questo periodo si basava sul pascolo di una cotica naturale e un'integrazione giornaliera di circa 450-600 gr di una miscela di concentrato commerciale e cereali in funzione del livello produttivo e dello stato corporeo di ingrassamento delle pecore (BCS). A partire dalla seconda settimana di Maggio sono stati introdotti (G0=giorno dell'introduzione) nel gruppo sperimentale arieti deferentomizzati (tastatori) in rapporto di 1 ogni 12 pecore per indurre mediante "l'effetto maschio" la sincronizzazione dell'estro e l'ovulazione.

Gli arieti tastatori sono stati lasciati nel gruppo fino all'inizio del presunto primo calore (G17), giorno in cui sono stati allontanati dalle femmine. Dal giorno 17 fino al giorno 24 le manifestazioni estrali sono state monitorate 4 volte al giorno da un operatore che, alle ore stabilite (8:00 am; 12:00 pm; 16:00 pm; 20:00 pm), introduceva l'ariete tastatore per rilevare i calori. Le pecore in estro venivano inseminate artificialmente per via vaginale 24 h dopo il rilievo del calore con seme fresco refrigerato a 15°C (400 milioni di spermatozoi per dose). Poiché i calori tra le 20:00 pm e le 8:00 am del giorno successivo non venivano monitorati dall'operatore gli animali trovati in estro alle 8:00 del mattino venivano avviati alla monta naturale.

Per ogni anno è stata calcolata la percentuale degli animali in estro nella settimana compresa tra il G17 e il G24. Per i soli anni 2008 e 2009 sono stati calcolati il tasso di fertilità come rapporto fra le pecore partorite da IA e le pecore inseminate e il tasso di prolificità come rapporto fra il numero di agnelli nati da IA e il numero di pecore partorite da IA.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nei tre anni di studio circa l'83% delle pecore (150/180) hanno presentato manifestazioni estrali tra il G17 e G24 (Tabella 1). Solo 123 pecore, pari all'82% delle pecore in estro, sono state inseminate artificialmente in quanto la rilevazione del

**Tabella 1** - Tasso di animali in estro, fertilità e prolificità di un allevamento biologico sottoposto ad un programma di IA senza l'uso di ormoni (\*parti novembre 2010).

Anno	Animali n°	Estro% (n° pecore in estro/n° pecore sotto effetto maschio)	Fertilità % (n° pecore partorite/n° pecore inseminate)	Prolificità % (n° agnelli nati/n° pecore partorite)
2008	60	78.3 (47/60)	56.4 (22/39)	122.7 (27/22)
2009	60	75.0 (45/60)	37.5 (15/40)	126.6 (19/15)
2010	60	96.6 (58/60)	*	*
Totale	180	83.3 (150/180)	46.8 (37/79)	124.3 (46/37)

loro calore è stata effettuata durante il periodo di monitoraggio giornaliero. Il tasso di fertilità relativo a 79 inseminazioni è stato del 47%. Il tasso di prolificità su 37 parti è stato del 124% (46 agnelli nati).

In conclusione possiamo affermare che effettuare un intervento di IA in un allevamento biologico senza l'impiego di trattamenti ormonali, ma sfruttando unicamente l'effetto maschio con un'inseminazione artificiale 24 h dopo l'inizio dell'estro rilevato con arieti tastatori porta a risultati prossimi a quelli raggiunti con trattamento classico riportati da Carta et al., (2009). Tali risultati fanno ben sperare circa la possibilità di partecipare a programmi di miglioramento genetico per allevamenti in regime di biologico. Tuttavia rimane da risolvere il problema dell'approvvigionamento del seme che in questo studio è stato reso possibile grazie alla prossimità della azienda con il centro di produzione di materiale seminale. Sono da approfondire pertanto gli studi sulla conservazione del seme per un periodo compreso fra le 24 e 72 ore dal momento della produzione per poter ipotizzare l'applicazione di questa tecnica su vasta scala.

*Lavoro eseguito nell'ambito del progetto "APQ per la ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica, progetto P5a - Attivazione del Centro di biodiversità animale per la valorizzazione del patrimonio animale con riferimento alla produzione e alla ricerca al servizio dell'allevamento" finanziato dalla Regione Sardegna.*

## ■ Artificial insemination in a sheep organic farm

**Key words:** ram effect, estrus synchronization.

## Bibliografia

Carta A., Casu S., and Salaris S. (2009). J. Dairy Sci. 92:5814-5833.



# Performance produttive di capre primipare di razza Sarda e Maltese tenute nelle stesse condizioni



N. DE RIU, C. SPANU, P. SEDDA, C. SCARANO, E. DE SANTIS, G. MONIELLO

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Sassari - Via Vienna, 2 - 07100 Sassari

**Parole chiave:** performance produttive, Primipare, Capra di razza Sarda, Capra di razza Maltese.

**INTRODUZIONE** - L'allevamento caprino in Sardegna insiste principalmente nelle zone più marginali, ove svolge un ruolo economico, sociale ed ambientale insostituibile. A tale tipologia di allevamento, essenzialmente con caratteristiche estensive, si affiancano alcune aziende semi-intensive o intensive, insediate in aree agricole più favorevoli rispetto alle precedenti. La razza Sarda costituisce una quota notevole del patrimonio allevato, sono però molto frequenti incroci con altri tipi genetici a maggiore specializzazione per la produzione latte, tra cui Saanen, Camosciata e Maltese. Quest'ultima in Sardegna è tenuta anche in purezza ed i capi iscritti al Libro Genealogico e sottoposti a controlli funzionali corrispondono a circa il 40% del totale nazionale (2500 capi; A.I.A. 2008); ma è di frequente allevata in condizioni difficili e con apporti alimentari insufficienti e/o inadeguati alle potenzialità produttive della razza. Pertanto, è sembrato utile studiare le performance produttive di entrambe le razze tenute contemporaneamente in due differenti condizioni di allevamento ed alimentazione.

**MATERIALI E METODI** - Il lavoro è stato eseguito nell'annata 2009, in 2 allevamenti (A e B) situati in provincia di Nuoro, caratterizzati da livelli manageriali diversi (discreto in A e buono in B); l'alimentazione era costituita prevalentemente da alimenti conservati nell'allevamento A e da pascolo con supplementazione di fieno e concentrati in B. In ciascuna delle due aziende sono state introdotte 13 caprette Maltesi (M) ed altrettante Sarde (S), tutte presunte gravide ed iscritte al Libro Genealogico della rispettiva razza. Esse provenivano da gruppi omogenei degli allevamenti di origine e sono state ripartite equamente ed a caso in quelli di destinazione. Tutti i soggetti erano identificati elettronicamente mediante bolo ruminale. La dieta adottata in entrambi gli allevamenti era quella utilizzata normalmente per gli animali nella stessa fase produttiva ed era costituita principalmente da pascolo con integrazione costante e regolare di fieno e concentrati nell'azienda B, mentre in A essa era rappresentata in primo luogo ed in massima parte di alimenti conservati, essendo la disponibilità di pascolo incostante ed insufficiente in alcuni periodi. Da sottolineare però il fatto che nell'azienda A la discontinua ed insufficiente disponibilità del pascolo non era compensata, per scelta economico-gestionale dell'allevatore, da adeguate supplementazioni di alimenti conservati. Ai fini del presente lavoro per ciascuna razza ed in ogni allevamento sono stati utilizzati 12 capi, su ciascuno dei quali sono stati registrati la data ed il tipo di parto. Dall'allontanamento dei capretti (circa 40 giorni dopo il parto) fino all'asciutta, su ciascun soggetto sono stati determinati mensilmente la quantità di latte prodotta nelle due mungiture giornaliere, il peso vivo ed il BCS. Su un campione di latte individuale, rappresentativo dell'intera mungitura è stata effettuata la determinazione individuale dei principali parametri qualitativi: grasso, proteine, lattosio e conta delle cellule somatiche mediante apparecchiatura automatica (Milkoscan) ed urea (metodo potenziometrico). Dai dati ottenuti nei singoli controlli mensili sono stati stimati la produzione totale e gli stessi parametri relativi all'intera lattazione. In coincidenza di ciascun controllo su animali e produzioni sono stati rilevati i dati sull'alimentazione e su 5 soggetti per ciascun gruppo è stato effettuato un prelievo di feci per il controllo mediante esame copro-microscopico della carica parassitaria. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA ponendo come effetti principali la razza (S e M) e l'allevamento (A e B).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il parto è avvenuto tra marzo ed aprile, la carica parassitaria è risultata nella norma per l'intero periodo della prova, durante la quale non sono stati evidenziati segni clinici di malattia. Il peso vivo è risultato sempre leggermente superiore nelle maltesi, ha mostrato in tutti i casi generale tendenza all'aumento, ma in

**Tabella 1** - Produzioni di latte (kg) e tenore (%) in grasso, proteine e lattosio (media±ds) di capre sarde (S) e maltesi (M) nelle aziende A e B. \*: P<0,05.

Gruppo	Latte	Grasso	Proteine	Lattosio
SA	83±15	7,20±2,1	3,68±0,7	4,64±0,3
SB	96±26	5,62±1,7	3,63±0,7	4,75±0,4
MA	125±34	4,97±1,1	3,02±0,3	4,57±0,3
MB	203±55*	5,28±1,3*	3,52±0,4*	4,63±0,2*
Tot. S	88±22	6,35±2,1	3,66±0,7	4,72±0,4
Tot. M	166±48*	5,17±1,2*	3,35±0,5*	4,61±0,3*

corrispondenza di riduzioni del BCS ha evidenziato un rallentamento senza differenze significative. La durata della lattazione e la produzione totale sono risultate mediamente di 146±9 giorni e 166±48kg per la razza Maltese, 126±16 giorni e 88±22kg per la Sarda, con differenze notevoli e significative tra i tipi genetici e le aziende sia per i livelli produttivi, sia per le caratteristiche qualitative del latte. Le produzioni medie di latte in entrambe le razze sono risultate superiori nell'allevamento B rispetto ad A (Tabella 1). Il tenore in grasso in entrambe le razze e gli allevamenti è stato sempre superiore a 4,2, ad eccezione di un prelievo nella Maltese (3,88). Come si può evincere dalla tabella 1 in entrambi gli allevamenti la razza sarda ha presentato un titolo in grasso superiore rispetto alla maltese in maniera più marcata nell'allevamento A. La percentuale in proteine è risultata complessivamente soddisfacente e sovrapponibile nei due gruppi di razza Sarda, ma nelle Maltesi è significativamente più elevata nell'allevamento B a testimonianza degli apporti alimentari inadeguati a supportare le potenzialità produttive della razza a maggiore specializzazione nell'allevamento A. Urea e lattosio sono risultati più elevati in entrambe le razze nell'azienda B. L'andamento ed il contenuto in cellule somatiche del latte nettamente superiore nelle maltesi in entrambe le aziende sono descritti in altra nota (Spanu *et al.*), a cui si rimanda.

I risultati ottenuti per le due razze messe a confronto evidenziano in maniera chiara la maggiore rusticità della Sarda ed il migliore adattamento alle difficili condizioni ambientali ed alimentari, tipiche degli allevamenti, che insistono nelle aree marginali della regione. Queste, invece si sono dimostrate notevolmente penalizzanti per le potenzialità della razza Maltese, come evidenziato dai risultati ottenuti nell'allevamento A caratterizzato da management ed alimentazione di livello inferiore. Nelle condizioni paratipiche più favorevoli dell'allevamento B le maltesi hanno mostrato livelli produttivi nettamente superiori alle sarde.

Lavoro eseguito con finanziamento Regione Autonoma Sardegna - azione P5A.

## ■ Productive performance of primiparous goats of Sarda and Maltese breeds held in the same farming condition

**Key words:** productive performance, Primiparas, Sarda goat breed, Maltese goat breed.

## Bibliografia

- A. I. A. (2008) - Bollettino dei controlli della produttività del latte. Caprini - Bufale.



# Effetto della tecnica di pascolamento sulla produzione di latte ovino



A. DI GRIGOLI<sup>1</sup>, G. DI MICELI<sup>2</sup>, M. TODARO<sup>1</sup>, V. BELLINA<sup>1</sup>, F. MAZZA<sup>1</sup>, M.L. ALICATA<sup>1</sup>, A. BONANNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., sezione di Produzioni Animali, Università di Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento A.A.T., Università di Palermo

**Parole chiave:** pascolamento turnato, sulla, latte ovino.

**INTRODUZIONE** - L'utilizzazione dei pascoli, su cui si basa l'alimentazione degli ovini da latte, comporta diversi vantaggi, tra cui la possibilità di sfruttare terreni non meccanizzabili, di ridurre i costi, di garantire un migliore benessere agli animali e di conservare la fertilità dei suoli<sup>1</sup>. A questi si contrappone il limite dato dall'irregolare disponibilità delle risorse foraggiere dei pascoli nel corso delle stagioni. In tale contesto, risulta importante utilizzare tecniche di pascolamento che consentano di aumentare e prolungare nel tempo la disponibilità dell'erba, in modo da mantenere più a lungo adeguati livelli d'ingestione e di produzione di latte. Tra le tecniche utilizzabili la turnazione potrebbe consentire di migliorare la produzione e la longevità della biomassa, di evitare l'eccessivo o basso sfruttamento del pascolo, di facilitare la ricrescita e permettere lo sfalcio dell'erba eccedente. Di contro, potrebbe indurre un più rapido invecchiamento dei tessuti fogliari e, quindi, uno scadimento qualitativo dell'erba; inoltre la gestione più complessa determinerebbe l'aumento dei costi<sup>2</sup>. L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti del pascolamento continuo o turnato su diverse specie foraggiere, quali la sulla (*Hedysarum coronarium*) e la consociazione di avena (*Avena sativa*) e trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum*), sulla produzione di latte ovino.

**MATERIALI E METODI** - La prova sperimentale è stata svolta nella primavera del 2008 con 32 pecore Comisane suddivise in 4 gruppi omogenei per produzione di latte, giorni di lattazione e peso vivo. I gruppi sono stati assegnati ai seguenti trattamenti: pascolamento continuo su 0,5 ha di sulla; pascolamento continuo su 0,5 ha di consociazione avena-trifoglio alessandrino; pascolamento turnato su 0,5 ha di sulla; pascolamento turnato su 0,5 ha di consociazione. Per la turnazione, i settori erano suddivisi in 4 sub settori, ciascuno di 0,125 ha. I turni di pascolamento sono durati 7 giorni per ogni sub settore nella prima utilizzazione e 5 giorni nella seconda utilizzazione. Gli animali venivano avviati al pascolo dalle 8.00 alle 18.00. Il peso vivo ed il BCS sono stati rilevati ad inizio e fine prova. Nel corso della sperimentazione, sono stati effettuati i seguenti rilevamenti: stima della disponibilità di fitomassa; prelievo di campioni di erba selezionata, mediante la tecnica dell'hand plucking; monitoraggio del comportamento degli animali al pascolo con osservazioni dirette ogni 15 minuti, volte a rilevare le attività di prensione di erba, l'ozio in piedi e il riposo in posizione di decubito; peso della produzione individuale di latte delle pecore e prelievo di un campione per la determinazione di lattosio, grasso, proteina, caseina e cellule somatiche (Combifoss 6000, Foss); prelievo di campioni del latte di massa per la determinazione di urea (CL-10 Plus, Eurochem), carica microbica (Bactoscan, Foss) e parametri di coagulazione (Formagraph, Foss). L'erba disponibile e selezionata dagli animali è stata analizzata per la determinazione di sostanza secca, proteina grezza, estratto etereo, ceneri, NDF, ADF e ADL. I dati sono stati analizzati con la procedura GLM del SAS 9.1.2. considerando i fattori fissi specie foraggera (SP) (consociazione e sulla), tecnica di pascolamento (TP) (continuo e turnato), periodo (P) (aprile e maggio) e le interazioni SP\*TP, SP\*P e TP\*P.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il pascolamento turnato ha determinato una maggiore produzione di foraggio rispetto al pascolamento continuo, in quanto l'adozione dei turni di utilizzazione consente alle essenze foraggiere di ricacciare in maniera indisturbata, così come riportato da altri autori<sup>3</sup>. Non sono emerse rilevanti differenze qualitative nel foraggio disponibile e in quello ingerito dagli animali per effetto della tecnica di pascolamento, mentre la sulla utilizzata sia in maniera continua che turnata ha mostrato un contenuto proteico

superiore rispetto alla consociazione. Le pecore al pascolo continuo hanno dedicato un tempo maggiore ad alimentarsi rispetto a quelle al pascolo turnato (180 vs 161 min/d;  $P \leq 0,05$ ), probabilmente a causa della minore quantità di erba che avevano a disposizione, ed hanno prodotto una maggiore quantità di latte (1070 vs 951 g/d;  $P \leq 0,05$ ), indipendentemente dalla specie pascolata. Tale risultato è in linea con quanto riportato da altri autori<sup>3,4,5</sup> che hanno potuto rilevare come alla maggiore produzione di foraggio ottenuta con il pascolamento turnato non corrisponda un aumento della produzione di latte. L'effetto del periodo ha influenzato molto la produzione di latte; nel primo periodo di maggiore disponibilità quanti-qualitativa di erba, le pecore hanno prodotto più latte rispetto al secondo periodo. Inoltre, in tale prima fase, le pecore che pascolavano la sulla hanno mostrato una maggiore produzione di latte rispetto alla consociazione (1377 vs 1159 g/d,  $P \leq 0,05$ ), mentre tale divario non è emerso nel secondo periodo. A causa dell'effetto diluizione, le pecore che pascolavano la sulla hanno prodotto un latte tendenzialmente meno grasso rispetto a quelle che pascolavano la consociazione (6,70 vs 7,14%,  $P \leq 0,05$ ). Il grasso è risultato più basso anche nel latte ottenuto nel primo periodo quando gli animali producevano più latte ed usufruivano di foraggi meno fibrosi rispetto al secondo periodo di pascolamento. Il latte delle pecore al pascolo turnato della sulla era più ricco in proteina e caseina rispetto a quello ottenuto con la sulla pascolata con metodo continuo. I valori di urea e della carica microbica del latte sono risultati nei limiti della normalità e non sono stati influenzati dalla tecnica di pascolamento. Anche i parametri di coagulazione del latte non hanno mostrato differenze fra i gruppi ed i valori ottenuti sono tutti nella norma. Per il peso vivo ed il BCS rilevati ad inizio e fine prova non sono emerse differenze significative fra i gruppi sperimentali. In definitiva, i risultati ottenuti contribuiscono anch'essi ad avvalorare la tesi secondo la quale il pascolamento turnato, sebbene consenta alle colture una maggiore possibilità di ricaccio che si tramuta in una maggiore produzione di biomassa per unità di superficie, non sempre determina incrementi della produzione di latte degli animali, e questo a causa del minore valore nutritivo del foraggio utilizzato in fasi di sviluppo più avanzate.

Ricerca finanziata con fondi del PRIN 2007XT947K e del Progetto nazionale STRUGO-SOPROZ del Ministero Politiche Agricole Alimentari e Forestali.

## ■ Effects of grazing technique on ewes' milk production

**Key words:** rotational grazing, sulla forage, sheep milk.

## Bibliografia

1. Bonanno A., Fedele V., Di Grigoli A. (2008). In A. Cannas and G. Pulina (Eds.) Dairy Goats Feeding and Nutrition. CAB International, Wallingford, UK. pp. 189-220.
2. Molle G., Decandia M., Ligios S., Fois N., Treacher T.T., Sitzia M. (2004). In: Pulina, G. (ed.) Dairy Sheep Nutrition. CAB International, Wallingford, UK, pp. 191-211.
3. Sitzia M., Sulas L., Porqueddu C., Fois N. (1996). Grassland and Land Use Systems. Proceedings of the 16th E.G.F., General Meeting, Grado, Italy, 611-614.
4. Cavallero A., Ciotti A. (1991). Rivista di agronomia, 25, 81-126.
5. Reyneri A. (1989). Rivista di Agronomia, 23, 297-305.

# Influenza della specie foraggera pascolata sulla produzione di latte ovino



A. DI GRIGOLI<sup>1</sup>, G. DI MICELI<sup>2</sup>, M. TODARO<sup>1</sup>, V. GENNA<sup>1</sup>, G. TORNAMBÈ<sup>1</sup>, M.L. ALICATA<sup>1</sup>, A. BONANNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo., Sezione di Produzioni Animali, Università di Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento A.A.T., Università di Palermo

**Parole chiave:** specie foraggere, pascolamento, latte ovino.

**INTRODUZIONE** - In Sicilia, nel comparto ovino, è in atto un processo di trasformazione dei modelli di allevamento estensivo in sistemi più intensivi specializzati per la produzione di latte. In tali sistemi, gli allevatori continuano a fare ampio ricorso al pascolamento per l'alimentazione degli animali, soprattutto durante il periodo primaverile di massimo rigoglio della vegetazione. D'altra parte, i sistemi di allevamento che si basano sul pascolamento sono i più convenienti, perché l'erba brucata direttamente dagli animali diminuisce i costi di produzione. Oltre ai pascoli naturali, vengono utilizzati anche prati ed erbai di varie specie in coltura pura o in consociazione. L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare gli effetti dell'utilizzazione al pascolo di diverse specie foraggere, quali la consociazione avena-trifoglio alessandrino, la sulla, e la cicoria, sulla produzione quanti-qualitativa di latte ovino.

**MATERIALI E METODI** - La prova sperimentale è stata svolta nella primavera del 2008 utilizzando 24 pecore Comisane suddivise in 3 gruppi omogenei per produzione di latte, giorni di lattazione e peso vivo. Ciascun gruppo ha utilizzato con pascolamento continuo uno di tre appezzamenti di 0,5 ha coltivati rispettivamente con un erbaio di avena (*Avena sativa*) e trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum*) in consociazione, un prato di sulla (*Hedysarum coronarium*) di secondo anno e un prato di cicoria (*Cichorium intybus*). Gli animali venivano avviati al pascolo dalle 8.00 alle 18.00. Il peso vivo ed il BCS sono stati rilevati ad inizio e fine prova. Nel corso della sperimentazione, con regolare cadenza, sono stati effettuati i seguenti rilevamenti: stima della disponibilità di fitomassa; prelievo di campioni di erba selezionata, mediante la tecnica dell'hand plucking<sup>1</sup>; monitoraggio del comportamento degli animali durante il pascolamento con osservazioni dirette ogni 15 minuti, volte a rilevare le attività di pascolamento (inteso come assunzione di foraggio), l'ozio in piedi e la posizione di decubito; peso della produzione individuale di latte delle pecore e prelievo di un campione per la determinazione di lattosio, grasso, proteina, caseina e cellule somatiche (Combifoss 6000, Foss); prelievo di campioni del latte di massa da ciascun gruppo sui quali sono stati determinati l'urea (CL-10 Plus, Eurochem), la carica microbica totale (Bactoscan, Foss) e i parametri lattodinamografici (Formagraph, Foss). L'erba disponibile e selezionata dagli animali è stata analizzata per la determinazione di sostanza secca, proteina grezza, estratto etereo, ceneri, NDF, ADF e ADL. I dati sono stati analizzati statisticamente con la procedura GLM del SAS 9.1.2, considerando i fattori fissi specie foraggera (SP) (consociazione, sulla e cicoria), periodo (P) (aprile e maggio) e l'interazione SP\*P.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La disponibilità di fitomassa è risultata inferiore per la cicoria rispetto alla consociazione ed alla sulla (rispettivamente 1242 vs 1911 e 2532 kg/ha ss). Quest'ultima si è distinta per le più elevate produzioni, a conferma di come, negli ambienti mediterranei, quando le condizioni termo-pluviometriche sono favorevoli, la specie leguminosa sia in grado di produrre molta biomassa, così come riportato in letteratura<sup>2,3</sup>. Il contenuto in proteina della sulla e della cicoria è risultato simile e superiore rispetto alla consociazione (rispettivamente 14,1 e 14,2 vs 9,8% ss). Inoltre la cicoria ha mostrato contenuti in sostanza secca ed in carboidrati strutturali più bassi rispetto alle altre specie, in quanto la stessa si è mantenuta verde e tenera per un più lungo periodo. L'erba selezionata dagli animali di tutti i gruppi è risultata di migliore qualità rispetto al foraggio disponibile in termini di sostanza secca, proteina grezza e contenuto in NDF, ADF e ADL, a riprova del fatto che gli animali, quando il pascolo è abbondante,

tendono a selezionare le specie e le parti di pianta più tenere, proteiche e meno fibrose. Il tempo dedicato dagli animali al pascolamento è stato inversamente proporzionale alla disponibilità di biomassa nei settori, quindi ha seguito un andamento decrescente passando dalla cicoria alla consociazione e alla sulla, e dal secondo al primo periodo. Nel complesso si è rilevata una maggiore produzione di latte negli animali che pascolavano la cicoria rispetto alla consociazione (rispettivamente 1243 vs 1003 g/d;  $P \leq 0.01$ ), mentre valori intermedi sono risultati con la sulla (1136 g/d). In riferimento al periodo sperimentale, sono emerse maggiori produzioni di latte nel primo periodo (1383 vs 873 g/d;  $P \leq 0.001$ ), corrispondente ad una maggiore disponibilità del pascolo. La superiorità produttiva dei gruppi che pascolavano la cicoria e la sulla rispetto alla consociazione è risultata significativa nel primo periodo; successivamente, nel secondo periodo, la cicoria ha consentito di contenere la riduzione della produzione di latte, più marcata per le altre specie foraggere. Tali risultati sono in linea con quelli di altri lavori scientifici che testimoniano il miglioramento delle produzioni di latte da parte degli animali che pascolano la cicoria<sup>4</sup> e la sulla<sup>5</sup>. Le percentuali in grasso, proteina e caseina del latte hanno subito un evidente effetto diluizione che ne ha provocato la diminuzione all'aumento della quantità di latte prodotto. L'urea nel latte di massa è risultata superiore, anche se con differenze non significative, nel latte delle pecore che pascolavano la sulla e la cicoria, più proteiche rispetto alla consociazione (rispettivamente 39,1, 40,6 e 33,1 mg/dl), e nel primo periodo rispetto al secondo (42,5 vs 32,8 mg/dl), quando gli animali pascolavano erbe più giovani. I parametri di attitudine alla coagulazione del latte di massa ( $r$ ,  $k_{20}$  e  $a_{30}$ ) non hanno mostrato differenze fra i gruppi sperimentali. Per il peso vivo ed il BCS rilevati ad inizio e fine prova non sono emerse differenze significative fra i gruppi. In conclusione, i risultati emersi confermano la notevole produttività della sulla e il suo effetto positivo sulla produzione di latte delle pecore che la utilizzano al pascolo. È stata evidenziata, inoltre, la notevole potenzialità della cicoria, ottima foraggera in grado di assicurare nel tempo una buona qualità dell'erba e di incrementare le performance produttive delle pecore da latte.

Ricerca effettuata con fondi del PRIN 2007XT947K e del progetto nazionale STRUGO-SOPROZ del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali.

## ■ Effects of grazing on different forage species on ewes' milk production

**Key words:** forage species, grazing, sheep milk.

## Bibliografia

1. Bovolenta S., Ventura W., Piasentier E., Malossini F. (1998). Annales de Zootechnie 47, 169-178.
2. Amato G., Di Miceli G., Giambalvo D., Scarpello C., Stringi L. (2005). Bullitta, S. (Ed.), Bioactive compounds in pasture species for phytotherapy and animal welfare. Cnr-Ispaam, Sassari, Italy, 41-54.
3. Molle G., Decandia M., Cabiddu A., Landau S.Y., Cannas A. (2008). Small Ruminant Research 77, 93-112.
4. Li G., Kemp P. D. (2005). Advances in Agronomy, 88, 187-222.
5. Rochon J.J., Doyle C.J., Greef J.M., Hopkins A., Molle G., Sitzia M., Scholefield D., Smith C.J. (2004). Blackwell Publishing Ltd., Grass and Forage Science, 59, 197-214.

# Calcinosi enzootica nelle capre: esperienze personali nella regione Sicilia



V. DI MARCO<sup>1</sup>, P.R. DELL'ARMELINA ROCHA<sup>2</sup>, M. FIASCONARO, G. FEDERICO<sup>3</sup>,  
V. ARONICA, S. MIGNACCA, S. MILONE<sup>4</sup>, I. VAZZANA, M. RUSSO, M.T. CAPUCCHIO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Messina) - Via S. Andrea, 96 - 98051 Barcellona P.G. (Messina), Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino - Via Leonardo da Vinci 44 - 10095 Grugliasco (Torino), Italia

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento Territoriale Regione Calabria, Via Nazionale, 5 - Reggio Calabria

<sup>4</sup> A.S.P. N° 5 - Messina

**Parole chiave:** capre, calcificazioni, polmone, vasi sanguigni.

**INTRODUZIONE** - La calcinosi è il deposito di sali di calcio in sede ectopica. Si tratta di un riscontro infrequente associato ad iperparatiroidismo, ipervitaminosi D o all'ingestione di vegetali che contengono composti analoghi ai metaboliti finali della vitamina D3 (colecalciferolo) l'1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> coniugata con un glucoside appartenenti comunemente ai generi *Solanum*, *Cestrum* e *Trisetum*. Nei ruminanti, in particolare, queste intossicazioni provocano calcificazioni sistemiche particolarmente evidenti in tessuti fibroelastici quali il cuore e i grossi vasi arteriosi. Talora si osservano anche fenomeni di calcinosi in sede polmonare o in altri organi quali tratto gastro-enterico, reni e muscoli. Gli Autori descrivono le lesioni ascrivibili a calcinosi enzootica riscontrate in n. 35 capre adulte, di razza autoctona, di età superiore ai 5 anni inviate al macello a seguito della operazione naturale di scarto che ogni anno l'allevatore mette in atto.

**MATERIALI E METODI** - L'allevamento ovi-caprino di provenienza di questi animali è ubicato all'interno del Parco delle Madonie. L'azienda di circa 200 ettari è caratterizzata da flora mediterranea e si estende su un territorio collinare e montano che va da 600 a 1000 m slm. Nel corso della visita ispettiva post-mortem numerosi organi sono stati sequestrati in quanto alla palpazione presentavano calcificazioni di diverso livello di gravità. In particolare, polmone, cuore, aorta toracica ed addominale, reni ed encefalo di tutti gli animali, dopo la valutazione macroscopica sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e processati routinariamente per l'esame istologico. Le sezioni istologiche ottenute sono state esaminate con la colorazione ematossilina-eosina e von Kossa. Campioni di sangue sono stati prelevati in sede di macellazione e sottoposti ad esame emocromo-citometrico. È stato inoltre effettuato il dosaggio sierico di calcio e fosforo.

**RISULTATI** - Macroscopicamente i polmoni si presentavano leggermente aumentati di volume in modo diffuso o focale, induriti, di aspetto stridente al taglio ed in sezione avevano l'aspetto simile a spugne calcificate. Le valvole cardiache erano ricoperte da placche o piccole scaglie biancastre opache. In due animali l'aorta mostrava multifocali placche ossificate. L'esame istologico ha rilevato depositi di sali di calcio di varie dimensioni in diversi organi. I polmoni presentavano lesioni di differente gravità, da fini calcificazioni a livello delle membrane basali delle pareti alveolari a calcificazioni di maggiori dimensioni associate a fenomeni di fibrosi interstiziale, metaplasia ossea, enfisema e flogosi non purulenta. Depositati di calcio apparivano localizzati lungo il decorso delle fibre elastiche dello strato sottoendoteliale dell'endocardio ed in taluni casi si estendevano per uno spessore cospicuo nell'endocardio stesso. Le fibre calcificate apparivano ingrossate, intensamente colorate e dissociate tra loro. In taluni punti le zone calcificate erano addirittura in preda a metaplasia cartilaginea. Gravi calcificazioni della tonaca inti-

ma e media si osservavano a livello aortico. I reni mostravano inoltre piccole calcificazioni multifocali nelle cellule tubulari e nella parete delle arterie. Non sono state osservate calcificazioni dei vasi encefalici.

Da una prima valutazione dei pascoli non è stato possibile individuare alcuna pianta riconosciuta ad azione calcinogenetica. L'acqua di abbeverata è risultata discretamente dura (31,8° f).

L'esame emocromocitometrico ha evidenziato valori di emoglobina ed ematocrito diminuiti, mentre i valori sierici di calcio e di fosforo erano nella norma.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONE** - Gli autori ritengono molto probabile che le lesioni anatomo-patologiche riportate siano ascrivibili a calcificazione metastatica da assunzione di piante calcinogenetiche probabilmente non conosciute come tali. La normale calcemia e fosfatemia al momento dell'indagine possono dipendere dal fatto che gli animali in quel periodo non stavano assumendo piante tossiche. L'età dei soggetti, le lesioni anatomo-patologiche e i valori dell'ematocrito e dell'emoglobina prossimi a quelli minimi di riferimento permettono di ipotizzare un'intossicazione cronica da assunzione stagionale, ma ripetuta negli anni, di piante calcinogenetiche non ancora identificate nella regione Sicilia. Poiché il *Solanum malacoxylon* non è presente in Italia ed il *Trisetum flavescens*, solitamente associato a calcinosi è molto raro in Sicilia, gli autori ipotizzano che la pianta ipoteticamente associata all'intossicazione appartenga al genere *Cestrum* o ad un genere sinora non riconosciuto come calcinogenetico. Dettagliate ricerche sono in corso sul territorio per la sua identificazione.

■ **Enzootic calcinosis in goats: personal investigations in Sicily**

**Key words:** goats, calcifications, lung, vessels.

## Bibliografia

1. Braun, U. Diener, M. Camenzind, D. Fluckiger, M. Thoma, (2000). Enzootic calcinosis in goats caused by golden oat grass (*Trisetum flavescens*). *Veterinary Record*. 146: 6, 161-162.
2. De Vernejoul M.C., Mautalen C.A., Miravet L. (1978). Le *Solanum Malacoxylon*: De la plante toxique à l'agente thérapeutique. *La nouvelle presse Médicale*, 3 juin 1978, n. 22.
3. Gufler, H. Novak, J. Reifinger, M. (2005). Enzootic calcinosis in sheep: clinical, sonographical, blood chemistry, and pathohistological findings. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift. BWK Public Relations - Brigitte Weber-Kraus, Wien, Austria* 92: 3, 58-65.
4. Jones Thomas C.- Hunt. *Patologia Veterinaria* - Tomo 1, cap. 3, Ed. Piccin Nuova Libreria - Padova 1987.
5. Mello J.R.B. (2003). *Calcinosis-Calcinogenic Plants*. *Toxicon* 41, 1-12.

## C. sintomatico in capre allevate in pascoli con *Ferula communis*



V. DI MARCO<sup>1</sup>, E. BANDINO<sup>2</sup>, M. RUSSO<sup>1</sup>, V. ARONICA<sup>1</sup>, A. PIZZIMENTI<sup>1</sup>, S. MIGNACCA<sup>1</sup>, C. PIRAINO<sup>1</sup>, M. FIASCONARO<sup>1</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri" - Area di Barcellona P.G. (ME)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico della Sardegna Dipartimento Territoriale di Nuoro

<sup>3</sup> Dipartimento di Patologia Animale - Torino

**Parole chiave:** *C. chauvoei*, *Ferula communis*, Carbonchio sintomatico.

**INTRODUZIONE** - Le miositi gangrenose sono sostenute da clostridi di differenti specie<sup>1</sup>. Particolare importanza ha il *C. chauvoei*, agente causale del Carbonchio sintomatico, malattia non contagiosa caratterizzata da miosite focale, gangrenosa, necrotizzante ed enfisematosa che provoca grave tossiemia e alta mortalità nei bovini ed in minor misura nelle pecore. Le capre, i suini, i cavalli sono colpiti di rado; uccelli, cani, gatti, conigli e uomo sono resistenti all'infezione. I segni clinici sono: febbre elevata, anoressia, depressione e morte in 12-36 ore, anche se la morte improvvisa, è frequente. Gli animali in fase di accrescimento e ben alimentati sono i più suscettibili. L'insorgenza della malattia è spesso stagionale e l'alimentazione può giocare un ruolo importante in particolare l'assunzione di *Ferula communis* può predisporre i soggetti allo scatenarsi della patologia. L'ingestione di ferula causa una diatesi emorragica dovuta ad una alterazione della coagulazione del sangue (ipoprotrrombinemia). I sintomi tipici della Ferulosi sono, rinorragia, ematuria, melena, anemia, aborto, ipotermia, ematomi, stato di torpore e prostrazione<sup>4</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio prende in considerazione un focolaio di Carbonchio sintomatico in capre Camosciate delle Alpi allevate allo stato semibrado in un'azienda, dislocata all'interno del Parco dei Nebrodi in provincia di Messina. L'azienda era composta da 93 caprini di razza Camosciata delle Alpi e di età compresa tra i 4 e i 6 mesi recentemente acquistati da 2 allevamenti del Nord Italia. Dall'anamnesi si evince che dopo l'acquisto, durante la giornata i capretti da rimonta, allevati in stalla, erano posti a pascolare in un'area dove era presente in abbondanza la *Ferula communis*. Dopo circa un mese si verificava il primo decesso di una capretta. Nel corso della primavera e dell'estate successiva sono deceduti 50 capi giovani di età inferiore all'anno con sintomi ascrivibili a Carbonchio sintomatico. Su 6 carcasse è stato fatto l'esame anatomo-patologico completo e sono stati prelevati campioni biologici (muscolo, fegato, rene, milza, linfonodo, cervello) per l'esecuzione di indagini batteriologiche ed istologiche. Per l'esame batteriologico i campioni venivano seminati in Agar Sangue (AS), in brodo Cooked Meat Medium (CMM) (Tarozzi), Brain-Heart-Infusion (BHI) addizionato di siero equino e brodo Tioglicolato semplice e incubati per 24 h in condizioni di anaerobiosi. Le prove biochimiche prevedevano: fermentazione di carboidrati, idrolisi dell'esculina, coagulazione delle proteine del latte, test della gelatinasi, nitrati, indolo, lecitinasi. Per l'indagine istopatologica gli organi sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati routinariamente e colorati con ematossilina eosina. È stato effettuato, inoltre, l'esame chimico con la metodica *Thin Layer Chromatography*, sul contenuto dei visceri di un soggetto deceduto e sull'estratto della pianta di *Ferula communis* raccolta nell'area di pascolo.

**RISULTATI** - Tutti i casi di morte improvvisa e di animali con sintomi clinici ascrivibili a Carbonchio sintomatico si sono verificati dopo 7-10 giorni dall'inizio del pascolo. L'ispezione dell'area antistante la stalla ha permesso di osservare cespugli di *Ferula communis* brucati all'estre-

mità. L'ipotesi dell'assunzione di ferula da parte dei caprini è stata supportata dal fatto che l'esame chimico ha fornito una traccia cromatografica sovrapponibile tra l'estratto dei visceri di un capo deceduto e l'estratto della pianta di *Ferula communis*. Gli animali colpiti presentavano febbre, perdita di appetito, depressione del sensorio, edema della spalla, del collo e degli arti che alla palpazione erano crepitanti. Il quadro anatomo-patologico era caratterizzato da polmonite emorragica ed edema gelatinoso. Al taglio si osservava la presenza di essudato giallastro-emorragico. Erano inoltre presenti piccole aree enfisematose, trama interlobulare ispessita ed epatizzazione dei lobi apicali. I muscoli degli arti erano crepitanti alla palpazione con presenza di petecchie e talvolta gravi quadri di emorragia, edema ed enfisema interstiziale. L'esame istologico dei muscoli scheletrici mostrava necrosi estesa, emorragie multifocali associate ad edema ed enfisema interfasciale. Si rilevavano inoltre enterite cronica non suppurativa, grave linfadenite iperplastica, congestione e degenerazione del rene e del fegato. L'esame microscopico degli strisci eseguiti per impronta evidenziava bacilli Gram positivi con grande spora centrale che deformava il corpo batterico. Da muscolo, fegato e rene è stato isolato in purezza *C. chauvoei*.

**CONSIDERAZIONI** - Il Carbonchio sintomatico è una grave malattia sistemica a carattere stagionale che talvolta può ricorrere enzooticamente. L'elevato numero di soggetti deceduti nel focolaio in oggetto è stato sicuramente condizionato da diversi fattori quali l'introduzione di una razza non autoctona in un territorio contaminato da spore e l'abbondanza di *Ferula communis*, che ingerita per diverse settimane ha provocato un'intossicazione cronica. Il fatto che non siano stati segnalati casi di mortalità fra i capretti che erano al pascolo con le madri e gli altri adulti, lontani dall'area dove erano stati posti i soggetti da rimonta conferma le ipotesi sopracitate. L'allontanamento dei capretti dal pascolo ha determinato l'arresto della mortalità e la scomparsa di casi clinici.

### ■ Clostridium chauvoei infection in goats grazing in pasture with *Ferula communis*

**Key words:** *C. chauvoei*, *Ferula communis*, Carbonchio sintomatico.

### Bibliografia

1. Greco G. (2008), "Enterotossiemia degli ovicapri in Italia: rilievi clinico-necroscopici e tossinotipi di *C. perfringens* associate", Riv. Zoot. Vet.; 39(2): 15-24.
2. Gagliardi G. (1996), "Le miositi clostridiali", O.D.V.; 7/8: 37-43.
3. Banfi E., Consolino F. (2000), "La Flora Mediterranea", Novara, De Agostini.
4. Appendino G., Tagliapietra S., Gariboldi P., Nano G.M., Picci V. (1988), "6-Oxygenated prenylated coumarins from *Ferula communis*", Phytochemistry; 27(11): 3619-3624.



# Effetto di giorni lunghi e melatonina sulla risposta all'effetto maschio nella capra Sarda



G. EPIFANI<sup>1</sup>, G. BOMBOI<sup>2</sup>, P. SECHI<sup>2</sup>, V. PASCIU<sup>2</sup>, B. FLORIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agenzia Agris Sardegna, Sassari - Olmedo (SS)

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Sassari

**Parole chiave:** giorni lunghi, melatonina, effetto maschio, capra Sarda.

**INTRODUZIONE** - La capra Sarda presenta un'attività riproduttiva stagionale che, di norma, inizia in estate-autunno e termina in inverno (Casu *et al.*, 1981). La necessità di far partorire le capre in autunno spinge l'allevatore ad anticipare la loro attività riproduttiva a giugno. Si pone allora la necessità di indurre e sincronizzare fuori stagione il maggior numero possibile di ovulazioni nelle capre. Di norma, l'obiettivo viene conseguito con un trattamento ormonale a base di FGA, cloprostenolo e PMSG. Il trattamento, tuttavia, comporta sia la produzione di anticorpi anti-PMSG che riducono gradualmente l'efficacia del trattamento, che la presenza di residui ormonali nel latte oltre i limiti consentiti. Poiché la stagionalità riproduttiva è regolata dal fotoperiodo, e l'introduzione improvvisa dei becchi nel gregge induce l'attività ovulatoria durante l'anestro stagionale, sia la manipolazione delle ore di luce che l'effetto maschio sono fattori non farmacologici in grado di indurre e, potenzialmente, sincronizzare l'attività ovarica delle capre (Chemineau *et al.*, 1986). Scopo del lavoro è stato quello di studiare l'effetto dei giorni lunghi (con o senza melatonina) sulla risposta all'effetto maschio nella capra Sarda, al fine di indurre e sincronizzare l'attività riproduttiva fuori stagione con un metodo morbido ed ecologicamente sostenibile (Martin *et al.*, 2004).

**MATERIALI E METODI** - Vennero utilizzate 78 capre pluripare di razza Sarda in lattazione, munte a macchina 2 volte/die, allevate in forma intensiva all'interno dello stesso caprile. 52 soggetti (gruppo T), dal 1° gennaio al 31 marzo ricevettero un regime luminoso 16L-8B; gli altri 26 vennero tenuti a luce naturale (gruppo C). Il 15 maggio, 26 soggetti del gruppo T ricevettero sottocute un impianto con 18 mg di melatonina. Pertanto, il gruppo T venne suddiviso in 2 sottogruppi: T1 (giorni lunghi + fotoperiodo naturale) e T2 (giorni lunghi + melatonina). Il 16 giugno vennero introdotti 6 becchi provati, tenuti a luce naturale, in numero di 2 per ciascun sottogruppo. I becchi, che venivano alternati fra i sottogruppi ogni settimana, vennero allontanati il 21 luglio. Settimanalmente, dal 2 giugno al 28 luglio, ad ogni capra venne prelevato un campione di sangue jugulare per dosare, tramite ELISA (Boscos *et al.*, 2003), il livello plasmatico di P4. Si riteneva avvenuta l'ovulazione quando il livello di P4 era  $\geq$  a 0,5 ng/ml, e la fecondazione se il livello era  $>$  di 1,0 ng/ml per 2 settimane consecutive. Il 23 settembre, su tutti i soggetti, venne effettuata una diagnosi ecografica di gestazione. Vennero registrati data di parto e prolificità. Basandoci su una gestazione standard di 152 gg abbiamo ritenuto che le capre partorite entro 167 siano state fecondate nei primi 15 gg di esposizione ai maschi.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nessun soggetto presentava attività ovarica al momento d'introdurre i becchi. Sulla base dei dati ecografici e di parto, non si sono manifestati aborti precoci e/o tardivi. Nel complesso, i soggetti T, che ricevettero i giorni lunghi, hanno manifestato una più precoce ripresa dell'attività ovarica associata ad una maggiore concentrazione di fecondazioni entro 2 settimane dall'introduzione dei becchi (Tabb. 1-2). Le differenze sono apparse altamente significative. I soggetti T2, che ricevettero anche la melatonina, hanno avuto migliori performance riproduttive rispetto ai T1 (solo giorni lunghi), in termini di soggetti fecondati e di prolificità, ma la differenza non è risultata significativa. I risultati si accordano nella sostanza con quelli di Pellicer-Rubio *et al.* (2007) per quanto concerne il gruppo T nel suo complesso, ma sono in disaccordo per quanto concerne il T2, in quanto la melatonina ha migliorato l'effetto dei soli giorni lunghi. In conclusione, il trattamento della capra Sarda con giorni lunghi in inverno, con o senza la successiva somministrazione di melatonina, ha consentito di migliorare la risposta all'effetto maschio verso la fine del periodo anestrato, anticipando e concentrando la ripresa dell'attività ovarica. È plausibile ritenere che un analogo trattamento luminoso, da effettuare sui becchi (con o senza melatonina), associato ad un buon flushing alimentare, possa ottimizzare la risposta da parte delle capre.

Lavoro effettuato con fondi RAS (Azione P05a: Attivazione del Centro di Biodiversità Animale).

■ Effect of long days and melatonin on the response to male effect in Sarda goat

**Tabella 1** - Risposta cronologica all'introduzione del maschio in termini di ripresa dell'attività ovarica (numero e percentuale di capre ovulanti e non ovulanti, fecondate e non fecondate); A,B =  $P < 0,001$ .

Gruppi	Ovulate entro 14 gg (%)	Ovulate totali (%)	Ovulate e fecondate (%)	Ovulate non fecondate (%)	Non ovulate (%)
C (n=26)	15 <sup>A</sup> (57,7)	25 (96,2)	19 (73,1)	6 (23,1)	1 (3,8)
T (n=52)	44 <sup>B</sup> (84,6)	52 (100,0)	50 (96,2)	2 (3,8)	–
<b>S. Gruppi T</b>					
T1 (n=26)	21 (80,8)	26 (100,0)	24 (92,3)	2 (7,7)	–
T2 (n=26)	23 (88,5)	26 (100,0)	26 (100,0)	–	–

**Tabella 2** - Risposta cronologica all'introduzione del maschio in termini di prestazione riproduttiva (numero e percentuale di parti, intervallo becco-parto, prolificità); A,B =  $P < 0,001$ .

Gruppi	Parti entro 167 gg (%)	Totale parti (%)	Intervallo becco-parto (media±ds)	Prolificità
C (n=26)	12 <sup>A</sup> (46,2)	19 (73,1)	165,6±6,6	1,4±0,5
T (n=52)	39 <sup>B</sup> (75,0)	50 (96,2)	164,3±7,5	1,5±0,5
<b>S. Gruppi T</b>				
T1 (n=26)	19 (73,1)	24 (92,3)	163,6±7,6	1,4±0,5
T2 (n=26)	20 (76,9)	26 (100,0)	164,9±7,5	1,6±0,5

**Key words:** long days, melatonin, male effect, Sarda goat.

## Bibliografia

- Boscos T.M., Samartizi F.C., Lymberopolous A.G., Stefanakis A., Belibaski S. (2003) - Assessment of progesterone concentration using enzyme immunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. *Reprod. Dom. Anim.* 38 (3):170-174.
- Casu S., Cappai P., Branca A. (1981) - L'attività sessuale della capra Sarda nei diversi periodi dell'anno. *Atti S.I.P.A.O.C.* IV, 137-153.
- Chemineau P., Normant E., Ravault J.P., Thimonier J. (1986) - Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fert.* 78, 497-504.
- Martin G.B., Milton T.B., Davison R.H., Banchero Hunzicker G.E., Lindsay D.R., Blache D. (2004) - Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:2341-246.
- Pellicer-Rubio M.T., Leboeuf B., Bernelas D., Forgerit Y., Pougnaud J.L., Bonnet J.L., Senty F., Chemineau P. (2007) - Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim. Reprod. Sci.* 98:241-258.

# Miasi cutanea degli ovini: acquisizioni eziopatogenetiche e gestione terapeutica di un focolaio di infestazione nell'Italia centrale



L. ERMINI<sup>1</sup>, G. GAGLIO<sup>2</sup>, G. SANNA<sup>3</sup>, A.P. PIPIA<sup>3</sup>, A. SCALA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Intervet Schering Plough Animal Health

<sup>2</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Messina

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia Animale, sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Università degli Studi di Sassari

**Parole chiave:** ovino, miasi cutanea, *Wohlfahrtia magnifica*.

**INTRODUZIONE** - La miasi cutanea degli ovini detta anche “*blowfly strike*”, è un’infestazione causata da diverse specie di ditteri tra cui vengono annoverate soprattutto quelle da *Wohlfahrtia magnifica* (Fam: Sarcophagidae), agente causale della cosiddetta “miasi delle piaghe”, identità nosologica diffusa principalmente nelle regioni europee meridionali ed orientali e quelle da *Lucilia sericata* (Fam: Calliphoridae), presente soprattutto, in Europa centrale.

La miasi da *W. magnifica* spesso evolve in forma severa; i siti di penetrazione delle larve sono le mucose esterne, specialmente quelle genitali, tanto nei maschi quanto nelle femmine. *L. sericata*, invece, è da considerarsi quale parassita facoltativo in quanto può utilizzare nel proprio ciclo biologico, tanto i tessuti in disfacimento quanto ospiti viventi.

La parassitosi negli ovini dei paesi del bacino del mediterraneo causata da *W. magnifica* viene spesso segnalata (Sotiraki et al., 2009); in Italia le miasi cutanee degli ovini rappresentano delle patologie diffuse e conosciute dagli operatori del settore, tuttavia le stesse raramente rappresentano l’oggetto dell’interesse dei ricercatori, infatti la letteratura scientifica, ad eccezione delle note “ufficiali” di Martinez e Lecquerq (1994) e di Giangaspero et al. (2010) su episodi causati da *W. magnifica*, a riguardo langue.

Per questi motivi ci è sembrato interessante riportare in questa sede alcune considerazioni eziopatogenetiche ed esperienze legate alla gestione profilattico-terapeutica di un grave focolaio di miasi cutanea negli ovini avvenuto nel periodo tardo primaverile del 2009 nel Lazio.

**MATERIALI E METODI** - Il focolaio oggetto della nostra comunicazione si è verificato in un gregge di 750 ovini da latte (Comisana X Sarda) transumante che pascolava nel periodo ottobre-giugno nell’agro romano in comune di Pomezia (Pratica di Mare - GPS: N 41° 39.958'; EO 12° 27.991'). Nei pascoli utilizzati, non vi erano strutture quali ricoveri e/o tettoie in grado di fornire un riparo agli ovini, mentre esistevano delle aree ombreggiate grazie alla presenza di alberi di alto fusto (eucalipto e pini). I pascoli si trovano a un’altezza media di circa 50 mslm, mediamente ventilata, soprattutto nel pomeriggio per la vicinanza al mare, ecc. Nel periodo di permanenza in agro romano il gregge era suddiviso in 2 gruppi (quota di rimonta e pecore in lattazione); contemporaneamente nei gruppi erano stati introdotti i maschi per il periodo delle monte.

A partire dal 10 maggio fino a tutto giugno 2009, periodo in cui si sono evidenziati i casi di miasi cutanea, sono stati controllati tutti i capi e rilevate le sedi anatomiche di lesione, dalle quali sono state prelevate le larve per la loro classificazione, effettuata grazie alle chiavi morfometriche indicate da Zumpt (1965). Una quota di queste prelevate dalle lesioni veniva utilizzata per una prova atta a valutare l’eventuale influenza della deltametrina (Butox® 7,5% Pour On) sulla loro vitalità. In particolare 6-7 larve venivano immerse subito dopo il loro isolamento in apposite capsule di Petri in plastica di 9 cm di diametro, la cui base era stata appositamente rivestita da carta assorbente imbibita di soluzione fisiologica (piastre controllo - PC) e da deltametrina al 7,5% (piastre trattamento - PT). Dopo aver collocato le larve nelle piastre, al momento dell’immissione delle stesse, dopo 30, 60 minuti, 24 e 48 ore, venivano effettuati dei controlli visivi atti a valu-

tarne la motilità/vitalità, tramite anche una stimolazione con apposite pinzette.

Sugli ovini con lesioni sede di larve di ditteri venivano attuati degli interventi farmacologici a base di fipronil e deltametrina (Butox® 7,5% Pour On).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Gli ovini con lesioni riportabili a miasi cutanee nel corso del periodo di monitoraggio presso il pascolo di Pratica di Mare erano in totale il 10,5% (79/750).

I primi episodi sono stati registrati a partire dal 10 di maggio e raggiungevano un picco massimo dal 27 maggio al 3 giugno. Le lesioni interessavano soprattutto la regione vulvare delle femmine in lattazione e il prepuzio dei maschi. Importante anche il coinvolgimento delle quote di rimonta colpite soprattutto a livello del padiglione auricolare in prossimità delle targhette di identificazione recentemente applicate. Tutti gli esemplari di larve isolate sono risultate appartenere alla specie *W. magnifica*. La terapia locale con fipronil spray consentiva la morte e successiva pronta eliminazione delle larve entro 24 ore; tuttavia in questi casi entro 72 ore si potevano reperire nelle stesse lesioni altre nuove larve. La terapia locale con deltametrina al 7,5% determinava ugualmente la morte e la successiva eliminazione delle larve che non ricomparivano più nella sede di lesione. Queste ultime, se non eccessivamente complicate, regredivano nell’arco di 10-15 giorni.

Le prove di laboratorio attuate per verificare il grado di sopravvivenza delle larve nelle piastre PT, hanno evidenziato la morte delle larve dopo 60 minuti dal loro contatto con la deltametrina, mentre quelle immerse nelle PC sopravvivevano anche a distanza di 48 ore e alcune larve di terzo stadio riuscivano ad impuparsi.

La presente segnalazione consente quindi di confermare, negli ovini del centro Italia, la presenza di miasi cutanee da *W. magnifica*, che possono costituire quindi nella stagione primaverile-estiva un importante problema sanitario, che nel periodo della lattazione, può trovare un buon approccio terapeutico tramite l’uso della deltametrina.

■ **Skin myiasis in sheep: etiopathogenic data and therapeutic management of a focus of infection in central Italy**

**Key words:** sheep, skin myiasis, *Wohlfahrtia magnifica*.

## Bibliografia

- Sotiraki S., Hall M.J.R., Farkas R. (2009) - Fleshflies in the flesh: epidemiology, population genetics and control of outbreaks of traumatic myiasis in the Mediterranean basin. Proc. VII Annual Meeting of EVPC, Toulouse, 31-35.
- Martinez R., Lecquerq M. (1994) - Data on distribution of screwworm fly *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner) in Southwestern Europe (Diptera: Sarcophagidae). Notes fauniques de Gembloux, 28: 53-60.
- Giangaspero A., Trentini R., Traversa D., Ruggeri E., Otranto D. (2010) - Traumatic myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in sheep in Italy. Parasitologia, in corso di stampa.
- Zumpt F. (1965) - Myiasis in Man and Animal in the Old World. Butterworths, London.

# Composizione chimica del latte di pecora in rapporto a due livelli di cellule somatiche



P. FORMAGGIONI<sup>1</sup>, P. FRANCESCHI<sup>1</sup>, S. SANDRI<sup>2</sup>, F. TOSI<sup>2</sup>, G. TEDESCHI<sup>2</sup>,  
M. MALACARNE<sup>1</sup>, P. MARIANI<sup>1</sup>, A. SUMMER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Scienza e Tecnologie Lattiero Casearie, Dip. Produzioni Animali BVQSA, Università Parma

<sup>2</sup> Centro Lattiero Caseario di Parma

**Parole chiave:** latte pecora, cellule somatiche, composizione chimica.

**INTRODUZIONE** - La qualità del latte riveste un ruolo importante in tutte le produzioni casearie per gli effetti sul rendimento della trasformazione e sulle caratteristiche del formaggio. Le infiammazioni del tessuto mammario si contraddistinguono per un aumento del contenuto di cellule somatiche del latte (Mariani et al., 2001) e determinano più o meno gravi disordini secretori con conseguenti alterazioni di composizione e delle proprietà fisico-chimiche del latte (Summer et al., 2003), tali da comportare una diminuzione della resa casearia (Klei et al., 1998). Rosati e collaboratori (2005) riportano come soglia fisiologica per il latte ovino il valore di 265'000 cellule/mL. Lo scopo della ricerca è stato studiare l'influenza di 2 livelli di contenuto in cellule somatiche del latte (fino a 265'000 e sopra 265'000 unità/mL) sulla composizione chimica del latte di pecora.

**MATERIALI E METODI** - Presso 3 allevamenti, ubicati nelle provincie di Parma e Reggio Emilia, sono stati prelevati 41 campioni di latte individuale, 22 presentavano un contenuto in cellule somatiche basso ( $\leq 265'000$  unità/mL; CB) mentre 19 si caratterizzavano per un contenuto di cellule elevato ( $> 265'000$  e inferiore a  $1'000'000$  cellule/mL; CE). Su ciascun campione sono state determinate, mediante Kjeldahl, le seguenti frazioni azotate: azoto totale (TN), azoto solubile (NS) e azoto non proteico (NPN) rispettivamente su latte tal quale, siero acido a pH 4,6 e filtrato TCA 12% (Aschaffenburg e Drewry, 1959), da cui sono stati calcolati i parametri: proteina grezza ( $NT \times 6,38/1000$ ), sieroproteina grezza ( $NS \times 6,38/1000$ ), caseina ( $(NT-NS) \times 6,38/1000$ ), indice caseina ( $(NT-NS) \times 100/NT$ ),  $NPN \times 6,38$  ( $NPN \times 6,38/1000$ ) e proteina vera ( $(NT-NPN) \times 6,38/1000$ ). I contenuti di grasso e lattosio sono stati determinati mediante letture nel medio infrarosso con Milko-Scan 134 A/B (Biggs, 1978); cellule somatiche con metodo fluoro-opto-elettronico mediante apparecchio Fossomatic 250 (Schmidt-Madsen, 1975); sostanza secca e ceneri, rispettivamente per essiccazione a  $102^\circ\text{C}$  e calcinazione in muffola a  $530^\circ\text{C}$  (Savini, 1946); cloruri per titolazione con nitrato di argento (Savini, 1946). A partire dalle ceneri, riprese con acido cloridrico 2N, è stato determinato il contenuto di fosforo, con metodo colorimetrico (Allen, 1940), e i contenuti di calcio e di magnesio, mediante spettrofotometria in assorbimento atomico (De Man, 1962). I valori ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica ANOVA tramite software SPSS18.0 impiegando come fattori fissi la classe delle cellule somatiche (CB o CE) e la stagione (inverno, primavera, estate ed autunno) e come covariate l'ordine di parto e i giorni di lattazione.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il contenuto in cellule somatiche del latte è risultato mediamente pari a  $170'000$  cellule/mL, minimo  $101'000$  e massimo  $236'000$  cellule/mL (dati non riportati in tabella) nel gruppo CB e mediamente pari a  $466'000$  cellule/mL, minimo di  $270'000$  e massimo  $839'000$  cellule/mL (dati non riportati in tabella) nel gruppo CE. Nella Tabella 1 sono riportati i valori delle medie stimate  $\pm$  errore standard delle principali caratteristiche chimiche del latte con contenuti cellulari elevati (CE) e bassi (CB). Il latte del gruppo CE si è caratterizzato per un minore contenuto di lattosio ( $4,05$  vs  $4,60$  g/100g;  $P \leq 0,01$ ), caseina ( $3,91$  vs  $4,28$  g/100g;  $P \leq 0,05$ ), indice di caseina ( $76,53$  vs  $79,03\%$ ;  $P \leq 0,001$ ), fosforo ( $131,31$  vs  $138,81$  mg/100g;  $P \leq 0,05$ ), calcio ( $157,28$  vs  $170,48$  mg/100g;  $P \leq 0,05$ ), e magnesio ( $14,59$  vs  $15,30$  mg/100g;  $P \leq 0,05$ ) rispetto a quello CB. Il latte del gruppo CE si è anche caratterizzato per un maggiore contenuto di sieroproteina ( $1,22$  vs  $1,15$  g/100g;  $P \leq 0,05$ ), ceneri ( $0,90$  vs  $0,87$  g/100g;  $P \leq 0,05$ ) e di cloruri ( $103,57$  vs  $93,17$  mg Cl<sup>-</sup>/100g;  $P \leq 0,05$ ).

In conclusione, il maggior contenuto di caseina del latte con meno di  $260'000$  cellule/mL, rispetto a quello con più di  $260'000$  cellule/mL, comporta maggiori valori di fosforo (+ 5,71%), calcio (+ 8,39%) e magnesio (+ 4,96%). Infine, il latte con meno di  $260'000$  cellule/mL, più ricco di lattosio (+ 13,58%), caseina (+ 9,46%), fosforo (+ 5,71%) e calcio (+ 8,39%) e con un più elevato indice di caseina (+ 2,5 u.p.) risulta di migliore qualità.

**Tabella 1** - Composizione chimica del latte di pecora con cellule basse ed elevate (Medie stimate  $\pm$  errore standard) (latte individuali).

		CE n = 19		CB n = 22		P <sup>a</sup>
		Media	ES <sup>b</sup>	Media	ES <sup>b</sup>	
Sostanza secca	g/100 g	17,80 $\pm$ 0,57		19,15 $\pm$ 0,47		NS
Lattosio IR	g/100 g	4,05 $\pm$ 0,10		4,60 $\pm$ 0,07		**
Grasso IR	g/100 g	8,00 $\pm$ 0,49		8,29 $\pm$ 0,39		NS
Proteina grezza	g/100 g	5,13 $\pm$ 0,22		5,41 $\pm$ 0,18		NS
Sieroprot. <sup>c</sup> grezza	g/100 g	1,22 $\pm$ 0,05		1,13 $\pm$ 0,04		*
Caseina	g/100 g	3,91 $\pm$ 0,18		4,28 $\pm$ 0,15		*
Indice caseina	%	76,53 $\pm$ 0,50		79,03 $\pm$ 0,42		***
NPN <sup>d</sup> $\times$ 6,38	g/100 g	0,18 $\pm$ 0,02		0,21 $\pm$ 0,01		NS
Proteina vera	g/100 g	4,91 $\pm$ 0,25		5,21 $\pm$ 0,18		NS
Ceneri	g/100 g	0,90 $\pm$ 0,02		0,87 $\pm$ 0,01		*
Fosforo	mg/100 g	131,31 $\pm$ 5,90		138,81 $\pm$ 4,98		*
Calcio	mg/100 g	157,28 $\pm$ 6,14		170,48 $\pm$ 5,18		*
Magnesio	mg/100 g	14,59 $\pm$ 0,77		15,30 $\pm$ 0,65		*
Cloruri (Cl <sup>-</sup> )	mg/100 g	103,57 $\pm$ 6,17		93,17 $\pm$ 4,52		*

<sup>a</sup> Significatività: NS, non significativo ( $P > 0,05$ ); \*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$  - <sup>b</sup> Errore standard - <sup>c</sup> Sieroproteina - <sup>d</sup> Azoto non proteico.

## Influence of two level of somatic cell content on chemical composition of sheep milk's

**Key words:** sheep milk's, milk quality, somatic cell content.

## Bibliografia

- Allen R. (1940) - The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34: 858-865.  
 Aschaffenburg R. Drewry J. (1959) - New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. *15th Int Dairy Congr.* 3: 1631-1637.  
 Biggs D.A. (1978) - Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61: 1015-1034.  
 De Man J.M. (1962) - Measurement of the partition of some milk constituents between the dissolved and colloidal phases. *J. Dairy Res.* 29: 279-283.  
 Klei L. Yun J. Sapru A. Lynch J. M. Barbano D. Sears P. Galton D. (1998) - Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. *J. Dairy Sci.* 81: 1205-1213.  
 Mariani P. Summer A. Formaggioni P. Malacarne M. Battistotti B. (2001) - Rilievi sui principali requisiti tecnologico-caseari del latte per la produzione di formaggio grana. *Sci. e Tecn. Latt.-Cas.* 52: 49-91.  
 Rosati R. Militello G. Boselli C. Giangolini G. Amatiste S. Brajon G. Bono P. Cannas A. Mugoni G. Simula M. Denti G. Gradassi S. Fagiolo A. (2005) - Determination of the national value of bulk tank somatic cell count and physiological threshold in sheep and goat's milk. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 56: 161-181.  
 Schmidt Madsen P. (1975) - Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J. Dairy Res.* 42: 227-239.  
 Savini E (1946) - Analisi del latte e dei latticini. Hoepli, Milano.  
 Summer A. Formaggioni P. Franceschi P. Malacarne M. Mariani P. (2003) - Proteose-peptone content in the milk of Italian Friesian cows with moderate and high somatic cell values. *Ital. J. Anim. Sci.* 2 (Suppl. 1): 266-268.

# Effetti di infezioni mammarie monolaterali sulla produzione e composizione del latte in pecore di razza Lacaune



G. GIACINTI<sup>1</sup>, S. AMATISTE<sup>1</sup>, A. TAMMARO<sup>1</sup>, C. BOSELLI<sup>1</sup>, B. RONCHI<sup>2</sup>, R. ROSATI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana - Via Appia Nuova, 1411 - Roma - Centro Nazionale di Referenza per la qualità del latte e dei prodotti derivati degli ovini e dei caprini (CReLDOC)

<sup>2</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia

**Parole chiave:** pecore da latte, mastiti, qualità del latte.

**INTRODUZIONE** - Controlli clinici eseguiti in allevamenti di ovini da latte hanno messo in evidenza una elevata incidenza di infezioni mammarie monolaterali, particolarmente frequenti con l'avanzare dell'età degli animali, rilevabili anche attraverso la valutazione morfologica della mammella.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di approfondire le conoscenze sugli effetti che le infezioni intramammarie (IIM) monolaterali provocano sulla composizione qualitativa e quantitativa del latte prodotto a livello di emimammella infetta e di emimammella sana.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato eseguito in un allevamento di pecore di razza Lacaune, situato nella provincia di Viterbo, costituito da 200 pecore in lattazione e provvisto di mungitrice meccanica. Sono state selezionate a *random* 30 pecore pluripare che sono state sottoposte a 5 controlli mensili nella fase intermedia di lattazione, durante la mungitura serale. Nessun caso di mastite clinica è stato osservato nel corso della prova. Sono stati prelevati 300 campioni di latte di emimammella per la ricerca di agenti mastidogeni (FIL-IDF, 1981). Su ogni emimammella è stata controllata la produzione di latte mediante un cilindro graduato ed è stato prelevato un campione di latte rappresentativo dell'intera mungitura. Su tali campioni sono stati determinati i seguenti parametri: grasso, proteine, lattosio, caseina, contenuto in cellule somatiche (CCS), pH (Comby-Foss 6000, Foss Electric), tempo di coagulazione (r), velocità di formazione del coagulo (k20), consistenza del coagulo (a30) secondo la metodica Zannoni ed Annibaldi, 1981 (Formagraph, Foss Electric); ioni Cl<sup>-</sup> mediante titolazione argentometrica (Mettler Toledo).

Sulla base dei controlli microbiologici, sono state individuate tre classi di emimammelle: tipo 1, emimammelle di soggetti senza IIM; tipo 2, emimammelle senza IIM di soggetti con infezione monolaterale; tipo 3, emimammelle con IIM. Sono state escluse dall'elaborazione statistica le emimammelle di soggetti con IIM bilaterali. L'analisi statistica è stata eseguita mediante SW MedCalc versione 9.5.1, con analisi della varianza (Anova). **RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Durante il corso della prova 15 soggetti (50%) hanno mostrato IIM monolaterale, (16,7%) IIM bilaterale, mentre 10 soggetti (33,3%) non hanno evidenziato IIM. La percentuale delle emimammelle infette è risultata pari al 16% (n. 48). Gli SCN sono risultati il principale gruppo di patogeni riscontrati con una percentuale del 75% (n. 36) rispetto al totale degli isolamenti.

Dal confronto tra emimammelle è emerso che l'emimammella di tipo 3 ha influenzato significativamente ( $P<0,001$ ) il CCS nella emimammella di tipo 2. Tali risultati sono in accordo con un nostro recente studio eseguito su pecore di razza Sarda. Come mostra la tabella 1, il CCS nelle emimammelle di tipo 2 risulta maggiore ( $P<0,001$ ) rispetto alle mammelle di tipo 1. Inoltre nelle emimammelle di tipo 1 si osserva un contenuto in lattosio significativamente ( $P<0,05$ ) più alto e un minore ( $P<0,001$ ) contenuto di ioni Cl<sup>-</sup> rispetto alle emimammelle di tipo 2 (Tabella 1). Nessuna variazione significativa è stata riscontrata in merito ai parametri grasso, proteine, caseina, indice caseinico e pH.

La consistenza del coagulo (a30) è risultata inferiore nel latte prodotto dalle emimammelle di tipo 2 rispetto a quelle di tipo 1 ( $P<0,05$ ), mentre non sono state osservate differenze per il tempo di coagulazione e la velocità di formazione del coagulo.

Lo stato sanitario della mammella ha influenzato significativamente ( $P<0,001$ ) la produzione di latte, facendo registrare una riduzione pari

**Tabella 1** - Valori medi dei parametri chimico-fisici, citologici e reologici relativi alle tipologie di emimammelle considerate.

Parametri	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Produzione per mungitura (ml)	182 <sup>A</sup>	129 <sup>B</sup>	108 <sup>B</sup>
Grasso (%)	8,19	8,40	8,02
Proteine (%)	5,97	6,03	5,97
Lattosio (%)	4,58 <sup>a</sup>	4,39 <sup>b</sup>	4,34 <sup>b</sup>
Caseina (%)	4,61	4,60	4,54
Ind. caseina (%)	77,2 <sup>a</sup>	76,36 <sup>ab</sup>	76,00 <sup>b</sup>
SCCx10 <sup>3</sup> /ml	144 <sup>A</sup>	575 <sup>B</sup>	954 <sup>B</sup>
pH	6,43	6,46	6,46
Cl <sup>-</sup> (g/l)	0,98 <sup>A</sup>	1,16 <sup>B</sup>	1,19 <sup>B</sup>
r (min)	19,54	18,58	19,76
K20 (min)	1,60	1,66	1,42
a30 (mm)	44,84 <sup>a</sup>	42,26 <sup>ab</sup>	39,45 <sup>b</sup>
Livelli di significatività: a, b = $P<0,05$ - A, B = $P<0,001$ .			

al 30% nelle emimammelle di tipo 2 rispetto alle emimammelle dei soggetti sani (tipo 1).

Le infezioni intramammarie unilaterali influenzano la qualità del latte e l'efficienza produttiva delle corrispondenti emimammelle sane. In assenza di IIM, il maggiore contenuto cellulare che si osserva nelle emimammelle sane di soggetti con infezione monolaterale è un fattore da considerare nell'individuazione di un valore soglia di SCC tra emimammelle sane e infette.

## ■ Effect of half udder infection on milk yield and composition in Lacaune dairy sheep

**Key words:** dairy sheep, mastitis, milk quality.

## Bibliografia

- G. Giacinti, A. Tammaro, R. Rosati, S. Amatiste, U. Bernabucci, Bruno Ronchi - 2007 Changes of milk yield and composition as affected by subclinical mastitis in sheep.
- Gonzalo, C., Ariznabarreta A., Carrjedo J. A., San Primitivo F. 2002 Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. J. Dairy Sci 85: 1460-1467.
- Rosati, R., Militello, G., Boselli C., Giangolini, G., Amatiste, S., Brajon, G., Gazzoni, S., Casini, M., Scatassa, M., Bono, P., Cannas, A., Mugoni, G., Simula, M., Denti, G., Gradassi, S., Fagiolo. (2005). Determination of the national value of bulk tank somatic cell count and physiological threshold in sheep's and goats' milk. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia. vol. 56, pp. 161-181.
- Dulin M., M.J. Paape, Schultze W.D., Weinland B.T. 1983. Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. J. Dairy Sci. 66, 2426-2433.



# Valutazione del latte ovino come bioindicatore della contaminazione del suolo da PCB



E. HERRERA<sup>1</sup>, M. ESPOSITO<sup>2</sup>, L. BALDI<sup>4</sup>, G. ROSATO<sup>3</sup>, G. COLARUSSO<sup>4</sup>, S. CAVALLO<sup>4</sup>, R. D'AMBROSIO<sup>4</sup>, F. SERPE<sup>2</sup>, P. TURNO<sup>5</sup>, M. AMORENA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Teramo - <sup>2</sup> IZS del Mezzogiorno

<sup>3</sup>Settore Veterinario Assessorato alla Sanità regione Campania

<sup>4</sup>ORSA Campania - <sup>5</sup> Veterinario Libero Professionista

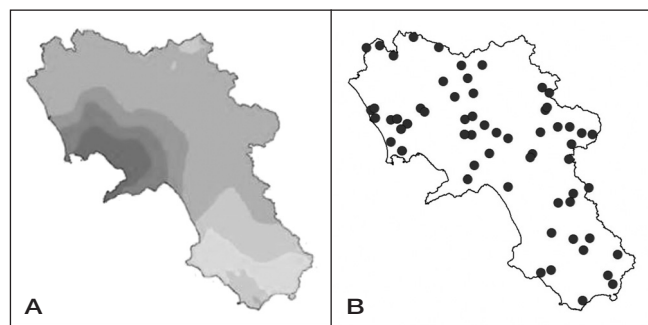
**Parole chiave:** PCB, latte, Sistema Informativo Territoriale.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare, mediante analisi geostatistiche, la relazione tra la contaminazione di PCB-diossina simili riscontrata nel latte ovino della Regione Campania e quella del suolo osservate nelle aree di pascolo. L'analisi ha evidenziato una correlazione positiva ( $R^2=0.22$ ) tra il latte e il suolo, lo studio però ha messo in evidenza che la relazione varia nello spazio. Quindi è stata studiata la relazione delle due variabili verso l'altitudine trovando una significatività statistica che ha permesso di realizzare la regressione per strati; una per dati di altitudine fino 100 metri ed un'altra da 300 metri in poi. Le regressioni hanno evidenziato un  $R^2$  di 0,5 e 0,59 rispettivamente e l'analisi dei residui ha mostrato che la contaminazione del suolo non è la sola variabile a condizionare il livello di contaminazione nel latte ovino.

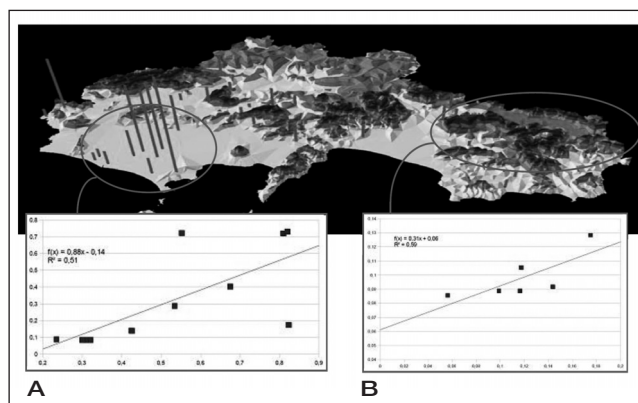
**INTRODUZIONE** - I PCB sono contaminanti organici persistenti che rappresentano un pericolo per la salute umana perché agiscono come interferenti endocrini<sup>1</sup>. Il latte ed i prodotti lattiero-caseari rappresentano una fonte molto importante di introduzione mediante la dieta<sup>2</sup>. La loro presenza negli alimenti è strettamente connessa al livello di contaminazione ambientale; sono composti che biomagnificano e l'impiego di bioindicatori è stato utile per spiegare dinamiche spaziali e temporali. L'allevamento ovino, quando effettuato al pascolo, riteniamo possa fornire informazioni sul livello di contaminazione dell'ambiente in cui vive il gregge. Infatti, per quegli inquinanti come i PCB, che vedono la via mammaria quale una delle principali vie di escrezione, il latte può rappresentare un indicatore dello stato di contaminazione ambientale<sup>3,4</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Nello studio si sono considerate due variabili: una dipendente (variabile A: la concentrazione di PCB-diossina simili nel latte di pecora) e una indipendente (variabile B: la concentrazione di PCB-DL nel suolo). I dati utilizzati provengono dalle determinazioni analitiche effettuate dalla Regione Campania durante i piani di monitoraggio (campagna 2008). Al fine di creare una mappa continua della contaminazione del suolo da PCB-DL, è stato impiegato il metodo di interpolazione di *Kriging*, utilizzando diversi parametri per ottenere i risultati più attendibili: tre diversi *lag size*, 11 semivariogrammi empirici e due parametri per i *neighbors*. Le interpolazioni risultanti sono state comparate attraverso il *Root Mean Square Error*.

**RISULTATI** - Nella Figura 1a viene riportato il risultato dell'interpolazione dei valori di contaminazione con PCB-DL nel suolo ottenuta mediante interpolazione *kriging* con 15 *neighbors* (almeno 10), un semivariogramma empirico circolare e un *lag size* di 4619.94m. Nella Figura 1b vengono indicati i luoghi di campionamento del latte ovino. Il risultato dell'analisi statistica dimostra che la variabile B è statisticamente significativa ( $p<0,05$ ). La successiva OLS (*ordinary least squares*) tra la variabile A e la B porta ad un  $R^2$  di 0.22. Nonostante la significatività statistica, il *Koenker* test indica che sono presenti delle variazioni regionali nella relazione tra le due variabili. Tali variazioni possono essere lega-



**Figura 1** - (A) Interpolazione della contaminazione del suolo con PCB-ds. (B) Punti di campionamento del latte ovino.



**Figura 2** - Regressione localizzata, da (A) 0 a 100 m con  $R^2=0,51$  e (B) più di 300 m con  $R^2=0,59$ .

te alla diversa altitudine<sup>5</sup> e, quindi, questa nuova variabile (C) è stata introdotta nell'analisi. L'analisi statistica ha evidenziato che la variabile C è significativa ma presenta anche una variabilità spaziale in relazione con la variabile A. Considerando la variabilità spaziale delle analisi precedenti, sono state fatte due regressioni in zone diverse; una a Nord-Ovest di Napoli "terra di lavoro" dove i livelli di contaminazione nel terreno sono più alti e una Sud-Est di Napoli "Vallo di Diano" con un'altitudine più elevata e compresa tra 300 e 900 m con i valori di contaminazione più bassi. I risultati si riportano nella Figura 2. Da queste analisi si osserva che il fenomeno della contaminazione del latte viene spiegato solo per il 50% ovvero la contaminazione riscontrata nel suolo influenza la contaminazione del latte solo in questa percentuale. Questo coincide con i risultati del *Morans'I* test: i residui della regressione sono *clusterizzati*, il che indica una mancanza di una variabile chiave nel modello.

**CONSIDERAZIONI** - La relazione tra la concentrazione di PCB-DL nel latte e quella nel terreno ("terra di lavoro") presentata nella Figura 2, presenta due valori, che se rimossi portano ad un valore di  $R^2$  di 0.97. L'eliminazione dei due punti non è possibile in quanto vanno approfondite le motivazioni della deviazione di questi due punti dalla tendenza generale che presentano gli altri. Tra le varie ipotesi di eccessiva variabilità del dato è che le pecore non sempre pascolano in un raggio definito e gli spostamenti del gregge, a volte, possono essere considerevoli e quindi possono rappresentare un errore al momento di relazionare la contaminazione locale del terreno con quella riscontrata nel latte.

## ■ Evaluation of the sheep milk as bioindicator of the soil contamination with PCB

**Key words:** PCB, milk, GIS.

## Bibliografia

- WHO. Regional Office for Europe (2000). Air Quality Guidelines - Second Edition. Chapter 5.10 PCBs.
- Costera A., Feidt C., Marchand P., Le Bizet B., Rychen G. (2005), *Chemosphere*; vol. 64 (4): 650-657.
- Iannuzzi L., Perucatti A., Di Meo G.P., Polimeno F., Ciotola F., Incarnato D., Peretti V., Caputi-Jambrenghi A., Pecoraro A., Manniti F., D'Alessandro, Vonghia. (2004), *Mutagenesis*; 19 (5): 355-359.
- Perucatti A., Di Meo G.P., Albarella S., Ciotola F., Incarnato D., Caputi Jambrenghi A., Peretti V., Vonghia G., Iannuzzi L. (2006), *Mutagenesis*; 21: 67-75.
- Wang P., Zhang Q., Wang Y., Wang T., Li X., Li Y., Ding L., Jiang G. (2009), *Chemosphere*; vol. 76: 1498-1504.

# Risposta immune in pecore infettate con *Mycoplasma agalactiae*



M.P. LA MANNA<sup>2</sup>, A. AGNONE<sup>2</sup>, S. VILLARI<sup>1</sup>, R. PULEIO<sup>1</sup>, A. TAMBURELLO<sup>1</sup>,  
A. DI DONATO<sup>3</sup>, G.R. LORIA<sup>1</sup>, G. SIRECI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Università di Palermo, Dip.to Biopatologia e Biotecnologie Mediche e Forensi

<sup>3</sup> IZO-Brescia

**Parole chiave:** Agalassia contagiosa, linfociti T, Interferone gamma.

**INTRODUZIONE** - L'Agalassia Contagiosa (CA) è una malattia endemica in molti paesi dove i piccoli ruminanti sono allevati per la produzione di latte, particolarmente nell'area mediterranea dove ancora è presente la mungitura manuale. Molti aspetti della risposta immune causata dall'infezione con questo patogeno sono poco chiari così come risulta lacunoso il rapporto fra immunità indotta dal micoplasma, gravità della malattia ed il rischio di contagio. Inoltre una approfondita conoscenza del rapporto fra risposta immune al *Mycoplasma agalactiae* e gli aspetti clinici della malattia può essere utile per mettere a punto e/o migliorare protocolli vaccinali, immunoterapie e test diagnostici in grado di prevenire l'infezione e/o diminuirne la disseminazione nel territorio. Negli ultimi anni sono stati commercializzati dei test ELISA in grado di rivelare la presenza di IgG nel siero degli animali infetti. Tuttavia questo test è maggiormente indicato per indagini di massa a non come test individuale. Scopo del presente studio è quello di rivelare una risposta immune *Mycoplasma agalactiae*-specifiche che possa completare e supportare la risposta umorale che attualmente si studia con metodi commerciali.

**MATERIALI E METODI** - N. 4 pecore, di 3-5 anni di età, di razza Comisana senza precedenti di episodi clinici di CA sono state selezionate per questo studio. N. 2 animali sono stati inoculati al day 0 con  $1 \times 10^6$  UFC di *Mycoplasma agalactiae* (MA), ottenuto da passaggi in coltura e titolato presso i nostri laboratori, per via intramammaria in entrambe le mammelle. Altre due pecore sono state inoculate con PBS. Gli animali sono stati controllati settimanalmente dal punto di vista clinico, e nel contempo si sono studiati il titolo anticorpale e la presenza del patogeno nel sangue, nel latte, nel fluido articolare (se si osservava un ispessimento) e nei tamponi oculari e nasali. Per isolare il patogeno, sono stati utilizzati terreni selettivi e metodiche descritte precedentemente (Nicholas e Baker, 1998): latte, tamponi oculari e nasali, gocce di fluido articolare sono stati coltivati in brodo e terreno semi-solido (Mycoplasma Experience, UK; Brodo e agar Mycoplasma, Oxoid, USA). Dopo 2-3 giorni di incubazione a 37 °C 10% CO<sub>2</sub>, i brodi sono stati piastrati su agar per l'osservazione delle colonie. I sieri sono stati saggiati in ELISA utilizzando un kit commerciale (Check-kit Agalactiae-Pourquier, Francia) per trovare IgG MA-specifiche. Per confermare la positività, si è utilizzata una amplificazione tramite PCR valida per tutti i ceppi isolati (Bashiruddin, 1998; McAuliffe et al., 2003). È stato messo a punto un nuovo metodo citofluorimetrico per studiare il grado di espansione di linfociti T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e TCRγδ<sup>+</sup> positivi per Interferon γ (IFN-γ), dopo esposizione *in vitro* dei linfociti a MA irradiato. Il grado di espansione dei linfociti T dopo riesposizione all'antigene ha consentito di rivelare l'incremento e l'attivazione di linfociti specifici per l'antigene. Campioni di sangue eparinato provenienti da pecore infette e da animali controllo, sono stati utilizzati per l'isolamento delle Cellule Mononucleate di Sangue Periferico (PBMC) per mezzo della soluzione Lympholyte® (Cederlane labs Canada). Le PBMC sono state quantizzate e messe in coltura in terreno RPMI 1640 con l'aggiunta di FCS 10% e Glutamina 1%. Al fine di ottenere un controllo positivo della reazione, alcune cellule sono state stimolate con Ionomicina (10 ng/ml, Sigma - Aldrich) e PMA 5ng/ml, Sigma - Aldrich. Per misurare *in vitro* l'espansione cellulare indotta dal *Mycoplasma*, è stato usato un antigene inattivato tramite irradiazione (60 Gray). Sifatto antigene è stato uti-

lizzato come stimolo specifico per le PBMC in coltura. Come controllo negativo inoltre sono state poste in coltura anche PBMC non stimolate. Dopo 24h dall'esposizione all'antigene, è stata aggiunta Monensina (3 μM, Sigma) in ciascun pozzetto, al fine di evitare la secrezione di IFN-γ nel mezzo. Dopo 48h dall'esposizione, le PBMC sono state raccolte e preparate per il saggio citofluorimetrico. Sono stati utilizzati anticorpi specifici diretti contro i marcatori di superficie CD4, CD8, TCRγδ<sup>+</sup> (AbD Serotec, UK), e la fluorescenza da essi prodotta è stata misurata tramite il citofluorimetro FACS-CAN.

**RISULTATI** - Le pecore cui è stato inoculato il *Mycoplasma agalactiae* hanno mostrato dopo 5 giorni dall'infezione, i segni tipici della agalassia contagiosa, consistenti prevalentemente in mastite bilaterale interstiziale. È stata osservata una eliminazione del patogeno da entrambe le mammelle dal giorno 5 al giorno 30 dall'infezione. Dopo 30 giorni le pecore sono entrate nel periodo di asciutta, quindi non è stato possibile raccogliere ulteriori dati microbiologici riguardanti la positività del latte al patogeno.

Nei sieri raccolti al day 0-15-30-60 c'erano IgG dal day 15 con un picco fra il day 30 e il day 60 dopo l'infezione. L'analisi citofluorimetrica ha mostrato un aumento delle cellule IFN-γ<sup>+</sup> fra il day 15 e il day 30 mentre al day 60 c'è stata una drastica riduzione di queste cellule. Lo studio del fenotipo delle cellule IFN-γ<sup>+</sup> antigene-specifiche ha rivelato un picco di CD4<sup>+</sup> al day 15 che diminuiva ai valori dei controlli al day 30 mentre al day 30 le CD8<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> avevano una percentuale doppia rispetto ai controlli. Le cellule γδ<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> dal day 30 al day 60 non erano aumentate rispetto ai controlli.

**CONCLUSIONI** - L'analisi citofluorimetrica dei subsets dei linfociti T antigene-specifici IFN-γ<sup>+</sup> durante l'infezione con MA ci dà la possibilità di correlare questi valori con la risposta anticorpale e i sintomi clinici. I linfociti T CD4<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> sembrano essere responsabili di una risposta immune precoce 15 giorni dopo l'infezione che è contemporanea all'aumento nel siero di IgG. 30 giorni dopo l'infezione la ratio CD4/CD8 si inverte a favore dei CD8 nella popolazione antigene-specifica e IFN-γ<sup>+</sup>. I linfociti T-γδ non sembra che si espandano almeno nell'infezione tardiva. Tuttavia nella fase tardiva dell'infezione (fra il day 30 e il day 60) c'è un plateau di IgG. In questa fase le cellule antigene-specifiche IFN-γ<sup>+</sup> diminuiscono. Questi dati ci consentono di ipotizzare che nel corso dell'infezione, dopo una precoce attivazione dei linfociti T sostenuta a due settimane dai CD4/IFN-γ<sup>+</sup> e a 4 settimane dai CD8/IFN-γ<sup>+</sup>, la risposta immune anti *Mycoplasma* diventa umorale Ig-mediata. Non possiamo escludere che la risposta anticorpale porti all'uccisione dei Micoplasmi anche grazie all'apporto di cellule NK o di altre cellule che legano l'Fc delle Ig con un meccanismo di Citotossicità Cellulare Anticorpo-dipendente (ADCC). L'uso del test citofluorimetrico può rappresentare un nuovo approccio nel monitoraggio dell'immunità delle pecore infettate con MA. L'espansione di cellule T antigene-specifiche IFN-γ<sup>+</sup> può essere importante in animali infettati e/o vaccinati, poiché le cellule produttrici IFN-γ potrebbero supportare i linfociti B nella secrezione di anticorpi. L'analisi immunologica dell'andamento dell'infezione in un più alto numero di animali può fornire dati più significativi dando la possibilità di speculare sul contributo dell'espansione delle cellule IFN-γ<sup>+</sup> nella risposta immune protettiva nei confronti del patogeno. Se l'espansione delle cellule IFN-γ<sup>+</sup> sarà confermato da altri studi, si potranno mettere a punto approcci immunoterapeutici basati su questo dato.

# Adenocarcinoma intestinale ovino: descrizione di un caso



E. LEPRI<sup>1</sup>, G. FILIPPINI<sup>2</sup>, I. DI MATTEO<sup>1</sup>, N. D'AVINO<sup>2</sup>, P. MANGILI<sup>2</sup>, G. VITELLOZZI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Sez. Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Perugia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** ovino, tumore, adenocarcinoma, intestino.

**INTRODUZIONE** - L'adenocarcinoma del piccolo intestino è tra i tumori spontanei più comunemente descritti nei piccoli ruminanti, in particolare nella pecora, con rare segnalazioni anche nella capra<sup>4</sup>. L'incidenza geografica di questa neoplasia è molto caratteristica; infatti la maggior parte dei casi si registra in Nuova Zelanda, ove la frequenza del tumore può raggiungere il 3% degli animali al di sopra dei 2 anni di età; in letteratura sono presenti sporadiche segnalazioni in UK, Australia, Islanda, Norvegia, USA, Canada e Spagna<sup>3,5</sup>. In Italia l'adenocarcinoma intestinale ovino è stato segnalato nel 1994<sup>6</sup>, ma da allora non sono riportati altri episodi. Ci è sembrato quindi interessante descriverne un ulteriore caso per evidenziarne aspetti anatomopatologici, difficoltà diagnostiche ed eventuali ipotesi patogenetiche.

**MATERIALI E METODI** - Una pecora adulta di 4 anni di età, di razza sarda, proveniente da un piccolo gregge mantenuto al pascolo in una zona dell'Umbria centrale, fu trovata morta al pascolo e sottoposta ad indagine anatomopatologica per determinare la causa di morte.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Alla necropsia le condizioni di conservazione della carcassa non erano ottimali, con fenomeni autolitici post-mortali in corso. L'animale si presentava in pessimo stato di nutrizione, con depositi adiposi pressoché assenti. L'addome era dilatato per la presenza di una notevole quantità di liquido bruno-giallastro, torbido, con fiocchi di fibrina; la superficie peritoneale, sia parietale che viscerale, era disseminata di noduli grigiastri di 1-20 mm; grande omento e mesentere erano uniformemente ispessiti (fino a 2 cm di spessore), di consistenza sclerotica, colore biancastro, e disseminati di piccole neoformazioni nodulari cistiche a contenuto fluido denso di diametro 1-2 mm; l'intestino era macroscopicamente nella norma, ad eccezione di una porzione di digiuno di circa 20 cm che si presentava inglobata in una reazione fibrinosa peritoneale ed aveva superficie sierosa irregolare e granuleggiante di colore rosso. I linfonodi mesenterici e gli altri organi addominali erano nella norma. Sulla base dell'aspetto macroscopico dell'imponente coinvolgimento peritoneale veniva emesso un sospetto di mesotelioma peritoneale. L'esame istologico delle sezioni di omento e mesetere metteva in evidenza una neoplasia di aspetto papillifero che cresceva all'interno di cavità cistiche ripiene di materiale di secrezione; cellule neoplastiche erano anche disperse nell'imponente reazione fibrosa che costituiva la maggior parte del tumore. Le cellule erano moderatamente PAS positive, così come il materiale di secrezione. Con l'immunoistochimica le cellule risultarono positive per pan-citocheratine (pan-CK), marker epiteliale, e negative per Vimentina, marker mesenchimale comunemente coespresso con le CK nel mesotelioma normale e nei mesoteliomi; sulla base di questi risultati il sospetto diagnostico di mesotelioma non venne confermato e si emise la diagnosi di carcinomatosi peritoneale diffusa secondaria ad adenocar-

cinoma intestinale. L'adenocarcinoma intestinale si presenta generalmente con ispessimenti anulari segmentali, singoli o multipli, di colore biancastro e consistenza aumentata; è infatti usuale rinvenire notevoli proliferazioni di tessuto fibroso associate al tumore (carcinoma scirroso); il coinvolgimento secondario peritoneale è comune e segue la diffusione linfatica dalla mucosa intestinale fino alla sierosa ed ai linfonodi. Raramente la diffusione peritoneale può essere più evidente del tumore primario ed imporre la diagnosi differenziale con il mesotelioma<sup>2</sup>. Quest'ultimo tumore, estremamente raro negli ovini, è spesso associato a contaminazione ambientale da parte di amianto o altre particelle metalliche, per le quali la pecora potrebbe rappresentare un monitor biologico<sup>1</sup>; al contrario l'eziologia dell'adenocarcinoma intestinale non è determinata, sebbene siano state avanzate ipotesi per giustificare la distribuzione geografica della neoplasia, che chiamano in causa fattori genetici, infettivi, tossine vegetali o sostanze chimiche, in particolare erbicidi a base di acido picolinico e altri<sup>1</sup>. Nessuno di questi fattori è stato individuato in questo caso. In conclusione il caso è interessante per la presentazione macroscopica del tutto atipica, che avrebbe potuto indirizzare verso una diagnosi errata senza l'utilizzo di indagini istologiche e soprattutto immunoistochimiche; la diagnosi precisa è fondamentale in quanto l'adenocarcinoma intestinale, colpendo animali adulti con una sintomatologia aspecifica e sovrapponibile ad altre malattie croniche debilitanti (parassitosi gastrointestinali, paratubercolosi) potrebbe essere sottodiagnosticato, precludendo così l'individuazione, anche nel nostro paese, di possibili fattori di rischio genetici o ambientali.

## ■ A case of ovine intestinal adenocarcinoma

**Key words:** ovine, intestine, tumor, adenocarcinoma.

## Bibliografia

1. DeNardo P., Bruni B., Paoletti L., Pasetto R., Sirianni (2004). *Sci Total Environ* 325 (1-3): 51-8.
2. Head K.W., Else R.W. and Dubielzig R.R. (2002). The Alimentary system. In Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*, 4th Edition Iowa State Press, Ames, Iowa, USA: 463.
3. Martin W.B. and Aitken I.D. (Eds) (2000). *Disease of the Sheep*. Third ed. Blackwell Science, Oxford: 383-385.
4. Pérez V., Corpa J.M. e García Marin J.F. (1998). *J Comp Path* 119, 311-316.
5. Pérez V., Corpa J.M. e García Marin J.F. (1999). *Vet Rec* 144 (3):76-7.
6. Vitellozzi G., Mughetti L., Ciorba A. e Mechelli L. (1994). *Argomenti di Patologia Veterinaria, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia* 36: 201-225.

# Primi risultati di proteomica clinica nell'anaplasmosi negli ovini



P. LOIZZO, I. ALLOGGIO, A. TRANI, E. PIERAGOSTINI

Dip. PROGESA - Università di Bari

**Parole chiave:** anaplasmosi, Suffolk, Comisana, risposta alla malattia.

**INTRODUZIONE** - L'anaplasmosi è una rickettsiosi generalmente benigna, ma persistente di ovini e caprini, endemica in zone tropicali e sub tropicali di vari paesi e di parte del sud e centro Europa (Stoltz, 1994). Gli ovini autoctoni pugliesi, come pure quelli originari delle regioni del sud Italia sono meno suscettibili a detta malattie rispetto a razze originarie di regioni settentrionali. Questo fenomeno sembra dovuto in parte ad una predisposizione genetica determinata dalla secolare convivenza degli animali autoctoni con i parassiti trasmessi dalle zecche. Così, nell'ambito del progetto SELMOL finanziato dal MIPAAF, razze nordiche e razze mediterranee sono state utilizzate come modello per investigare la risposta genetica alle malattie da zecche. Nel corso di detto studio alla ricerca delle cause della diversa risposta alla malattia, registrata, su soggetti di razza Suffolk (suscettibile) e di Comisana (resistente), a seguito dell'infezione sperimentale mediante *Anaplasma ovis*, è venuta maturando l'idea di verificare le eventuali modificazioni nel *pattern* proteico, partendo dal presupposto che la composizione proteica del siero ematico contiene tutte le informazioni sullo stato dell'organismo in condizioni di salute e di malattia. Mentre nel campo della medicina umana sono ampiamente documentate le opportunità diagnostiche ed anche prognostiche offerte dalle tecniche proteomiche, nell'ambito delle scienze cliniche veterinarie esse sono ancora agli esordi, con alcune ricerche sugli animali domestici tese alla identificazione di variazioni proteiche in ambito fisiopatologico, (McCaw et al., 2007; Yang et al., 2009). Il presente lavoro rappresenta un primo passo verso un'analisi proteomica di clinica comparata dell'anaplasmosi, riportando i risultati dell'esame delle mappe bidimensionali ottenute analizzando il siero di sangue di soggetti delle succitate razze nel confronto dello stato fisiologico (M1) con quello patologico (M2).

**MATERIALI E METODI** - *Campioni*. Otto campioni di siero di agnelli Suffolk (4) e Comisana (4) di circa 6 mesi di età sono stati selezionati in base alla razza e al sesso ed alla risposta alla malattia definita severa, media o blanda.

**Analisi**. I campioni sono stati pretrattati mediante cromatografia di affinità su colonna per allontanare l'albumina che rappresenta la quota proteica prevalente del siero di sangue; questo perché la presenza nel siero di proteine largamente espresse quali l'albumina tende a mascherare la presenza di specie proteiche poco rappresentate. I campioni così purificati sono stati analizzati mediante elettroforesi bidimensionale (2D) su gel di poliaccrilammide (SDS-PAGE).

**Analisi dati e statistica**. Le mappe 2D ottenute sono state analizzate mediante il programma ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences) confrontate con la mappa 2D di Plasma Human-*Homo Sapiens* presente sul sito ExPASy Proteomics Server nel database SWISS-2DPA-GE. Sui dati è stata effettuata l'analisi GLM (S.A.S. 1990) considerando la variabile sesso e la "Differenza" (M2-M1) in base alla sintomatologia.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Dall'analisi delle mappe 2D sono state individuate 17 zone (Z1-Z17) rilevanti ai fini della nostra indagine, di cui quattro (Z14-Z17) presenti solo nelle femmine. La zona 9, in cui si trovano proteine a peso molecolare (PM) compreso tra 18 e 20 kDa, dal confronto con la mappa di bidimensionale del plasma umano, corrisponde alla zona delle IGLC\_HUMAN (Immunoglobulin light chain). Negli individui Suffolk, questa zona, non presenta particolari variazioni tra stati ed è generalmente più ricca rispetto a quella rilevata nei Comisani, per i quali, però, si nota un incremento del numero di macchie, passando da M1 a M2. La zona 11, ad alto peso molecolare con pI tra 5.5 e 6 e PM al di sopra dei 100 kDa, corrisponde a quella rappresentata nella 2D del plasma umano da CFAB\_HUMAN (Complement factor B). Tale zona, presente in tutte le femmine, è più ricca di macchie in quelle ammalatisi gravemente. Nelle femmine malate, Comisane e Suffolk, compare una zona indicata come zona15; detta zona, ad alto peso molecolare, pI compreso tra 6.3 e 7 e PM intorno a 100 kDa, è molto ricca di macchie che, dal confronto con la 2D del plasma umano, si sovrappongono a quelle indicate come IGHG (Immuno-globulin heavy chain

**Tabella 1** - Medie stimate delle differenze nel numero di macchie registrate nelle mappe 2D di tutti i soggetti tra i due momenti (M2-M1) nei soggetti classificati in base alla risposta alla malattia.

Sintomatologia	Media stimata	Errore standard
Blanda	82.0000000 <sup>a</sup>	19.8259090
Media	12.3333333 <sup>b</sup>	16.1877869
Severa	-10.0000000 <sup>b</sup>	16.1877869

gamma). Parimenti, la zona16, pI intorno a 5 e PM compreso tra 100 e 150 kDa, potrebbe essere assimilata alle proteine CERU\_HUMAN Ceruloplasmin (Ferroxidase). Tale zona è presente solo nelle femmine ammalatisi in modo grave e aumenta nel numero di macchie passando da M1 a M2. Comunque, perché possano assumere un qualche significato, queste valutazioni qualitative dovranno essere analizzate in dettaglio con l'ausilio della spettrometria di massa per verificare le classi proteiche nell'ambito delle varie zone ed individuare le singole proteine.

Descrizione a parte, una prima valutazione di tipo quantitativo ci consente tuttavia di evidenziare un paio di risultati significativi. Il primo, riguarda la differenza tra i sessi ed in particolare, il fatto che il numero medio di macchie dei maschi (115) è inferiore ( $P < 0,05$ ) a quello delle femmine (295). Più intrigante e meno scontato è invece il risultato che emerge osservando la Tabella 1, nella quale sono riportate le medie stimate delle differenze nel numero di macchie registrate nelle mappe 2D di tutti i soggetti tra i due momenti (M2-M1) e nella quale si osserva una differenza significativa ( $P < 0,05$ ) tra i soggetti con blanda sintomatologia, che di fatto hanno retto all'attacco del patogeno e quelli nei quali si è avuta la malattia più o meno violentemente conclamata (Media e Severa). Nei soggetti a blanda sintomatologia si riscontra un aumento significativo del numero delle macchie al momento in cui sono stati registrati i sintomi (M2), come se la capacità di contrastare efficacemente l'attacco del patogeno fosse proporzionale alla capacità di sventagliare un ampio repertorio proteico.

Se la causa di questo fenomeno sia di natura genetica e/o epigenetica al momento non è dato definirlo, ma mettendo insieme il dato quantitativo con le informazioni descrittive, che indicano alcune zone nelle quali è presente una differenza quali-quantitativa in funzione dei due stati, si delinea la strategia da seguire per la prosecuzione dello studio, auspicando di riuscire ad identificare marcatori biologici atti a valutare i soggetti potenzialmente più adatti a lottare con il patogeno.

## ■ Preliminary results from clinical proteomic investigations of anaplasmosis in sheep

**Key words:** anaplasmosis, Suffolk, Comisana, risposta alla malattia.

## Bibliografia

- McCaw D.L., Chan A.S., Stegner A.L., Mooney B., Bryan J.N., Turnquist S.E., Henry C.J., Alexander H., Alexander S. (2007) Cancer Therapy: Preclinical: Proteomics of Canine Lymphoma Identifies Potential Cancer-Specific Protein Markers. Clin Cancer Res, 13:2496-2503.
- Petazzi, F., de Ruvo G., Alloggio I., Rubino G., Alongi A., Torina A., Pieragostini E. (2009). Clinical findings in susceptible and tolerant sheep after experimental infection with *Anaplasma ovis*. In: 17<sup>th</sup> International Congress FeMeSPRum. Perugia, 27-30 May 2009.
- SAS, 1990: SA/Stat User's Guide, Version 6, 4th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Stoltz, W.H. (1994) Ovine and caprine anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R. and Tustin, R.C. (eds) Oxford University Press, Oxford, pp. 431-438.
- Yang Y., Zhao X., Zhang Y. (2009) Proteomic analysis of mammary tissues from healthy cows and clinical mastitic cows for identification of disease-related proteins. Vet. Res. Comm. 33, 295-303.



# Descrizione di un episodio abortivo sostenuto da *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in un allevamento ovino e caprino



C.F. MAGISTRALI<sup>1</sup>, N. D'AVINO<sup>1</sup>, E. MANUALI<sup>1</sup>, M. BIAGETTI<sup>1</sup>, A. DETTORI<sup>1</sup>, G. ZABALDANO<sup>2</sup>, P. MANGILI<sup>1</sup>, M. LAURENTI<sup>3</sup>, G. FILIPPINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Area Diagnostica integrata, istituto Zooprofilattico Umbria e Marche, Perugia

<sup>2</sup> Libero professionista, Cuneo

<sup>3</sup> Laboratorio analisi, Associazione Provinciale Allevatori, Cuneo

**Parole chiave:** aborto, capra, pecora, *Campylobacter fetus fetus*.

**INTRODUZIONE** - *Campylobacter fetus* è un patogeno animale e umano che può essere diviso in due sottospecie: *fetus* e *venerealis*. Mentre *C. fetus* subsp. *venerealis* è caratterizzato da un *host range* ristretto alla specie bovina, dove provoca aborto enzootico, *C. fetus* subsp. *fetus* presenta un *reservoir* più ampio, e può essere isolato da diverse specie di mammiferi, rettili e nell'uomo<sup>1</sup>. In alcuni paesi, tra cui ad esempio la Nuova Zelanda, l'infezione da *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* è considerata tra le principali cause di aborto nella pecora<sup>6</sup>. All'interno dei greggi gli aborti, di tipo tardivo e caratterizzati da lunghi tempi di incubazione, assumono un andamento caratteristico, di tipo epidemico<sup>4</sup>. Nella capra la campilobatteriosi è considerata un evento più raro. In Italia, la campilobatteriosi non è inserita tra le patologie abortive più frequenti nell'allevamento ovino e caprino. In letteratura sono stati descritti due episodi abortivi da *Campylobacter* spp. nell'ovino, nel 1983 e nel 1994, entrambi correlati alla presenza di *Campylobacter jejuni*<sup>11,13</sup>. Scopo di questo lavoro è segnalare un episodio di patologia riproduttiva sostenuta da *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, caratterizzato da aborti e nascita di soggetti disvitali, in un allevamento italiano di pecore e capre, verificatosi a gennaio- febbraio 2010.

**MATERIALI E METODI** - Allevamento: a conduzione familiare, si presentava a gestione mista, con la presenza di pecore (90 soggetti circa) e capre (25 soggetti circa). L'anno precedente, dopo l'introduzione di 17 pecore di razza Suffolk, di provenienza nazionale, si erano già verificati casi di aborto, senza che fosse stato possibile formulare una diagnosi eziologica. L'episodio abortivo descritto nel presente lavoro si è verificato nei primi mesi del 2010, provocando l'aborto in 4 pecore e 4 capre, e la morte di 47 agnelli e capretti nati disvitali. La mortalità degli agnelli era preceduta da un corredo sintomatologico caratterizzato da debolezza, astenia e depressione del sensorio. Da uno dei capretti disvitali è stato effettuato un esame anamopatologico, seguito da indagini di laboratorio.

Porzioni di cervello, fegato e polmone sono stati fissati in formalina al 4% ed inclusi in paraffina. Sezioni di 5 µm di spessore sono state colorate con Ematossilina-Eosina (E-E). Sono stati eseguiti i seguenti test: esame batteriologico da fegato, contenuto del IV stomaco, cervello<sup>9</sup>, PCR per *Brucella* spp. dal contenuto del IV stomaco<sup>10</sup>, PCR per *Chlamydia abortus* da polmone<sup>13</sup>, PCR per Border disease virus da campione di milza, PCR per *Neospora* e *Toxoplasma* da cervello<sup>5</sup>, ricerca di *Listeria* spp. da cervello tramite esame colturale<sup>9</sup>, PCR per *Leptospira* spp. da rene<sup>7</sup>, esame colturale per *Campylobacter fetus* da fegato e contenuto IV stomaco, con semina su Karnali agar e incubazione in microaerofilia (Campygen, Oxoid) per 48 ore a 37°C<sup>8,9</sup>. Le colonie isolate sono state successivamente sottoposte a caratterizzazione morfologica e biochimica (colorazione di Gram, catalasi, ossidasi, sviluppo a 37° e 42°C) e biomolecolare mediante PCR, sulla base di quanto indicato da Hum<sup>2</sup>.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - All'esame anatomopatologico è stato possibile osservare una modica quantità di liquido sieroso-emorragico in cavità peritoneale e pericardica, e la presenza a livello epatico di numerosi focolai grigiastri con una leggera depressione centrale e diametro di circa 1cm, disseminati in tutto il parenchima, mentre istologicamente si è evidenziata un'epatite purulenta necrotica multifocale. Tutti i test di laboratorio hanno fornito esito negativo ad eccezione del-

l'esame colturale per *C. fetus*, che ha visto lo sviluppo di colonie morfologicamente attribuibili al genere *Campylobacter* sia dal IV stomaco che dal fegato, successivamente identificato come *C. fetus* subsp. *fetus* tramite PCR. A seguito della diagnosi di campilobatteriosi, in allevamento è stato eseguito un trattamento con tetraciclina *long acting*, ed allestito un vaccino stabulogeno. Gli episodi abortivi si sono interrotti, si sono tuttavia registrate alcune morti nei soggetti nati disvitali. Nonostante in alcuni paesi la campilobatteriosi sia considerata una causa frequente di aborto nella pecora, sulla base di quanto ci è stato possibile accertare, non vi sono segnalazioni di infezione da *C. fetus* subsp. *fetus* nella capra e nella pecora in Italia. Nel caso oggetto della presente segnalazione, è possibile che il batterio abbia fatto ingresso in azienda nel 2009 tramite i soggetti di nuova introduzione, e si sia in seguito diffuso alle pecore ed alle capre. È infatti noto come l'immissione di animali infetti sia la più comune via di introduzione di questo batterio in un gregge<sup>4</sup>. Da un punto di vista terapeutico, dopo la somministrazione di tetraciclina è stato possibile osservare la cessazione degli eventi abortivi. Nel caso da noi osservato, la presenza di lesioni indicative per campilobatteriosi poteva assumere un ruolo determinante nella formulazione di un sospetto diagnostico.

## ■ An outbreak of abortion caused by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* in a caprine herd: a case report

**Key words:** abortion, goat, sheep, *Campylobacter fetus fetus*

## Bibliografia

- Dingle K., Blaser M., Zu Z., Pruckler J., Fitzgerald C., van Bergen M., Lawson A., Owen R., Wagenaar J.A. (2010) J. Clin. Microbiol. 48 (3): 977-980.
- Hum S., Quinn K., Brummer J., On SL. (1997) Aust. Vet. J. 75 (11), 827-831.
- Ligos C., Liciardi M., Satta G., Depalmas S. (1994) Atti Soc. It. Sc. Vet. 48.
- Linklater K.A. in: Martin W.B., Aitken I.D. (2000) Diseases of sheep. Blackwell publishing. 3th ed. 107-113.
- Magnino S., Vigo P.G., Bandi C., Rosignoli C., Boldini M., Vezzoli F., Alborali L., Cammi G., Foni E., Colombo N., Colombo M., Bergami C., Mellini A., Fabbi M., Genchi C. (2000) La Selezione Veterinaria, Suppl; S15-S23.
- Mannering S.A., West D.M., Fenwick S.G., Marchant R.M., O'Connell K. (2006) Vet Microbiol 115: 237-242.
- Merien F., Amoriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. (1992) J. Clin. Microbiol. 30, 2219-2224.
- OIE terrestrial manual 2008. www.oie.com
- Quinn P.J. Carter G.R. (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Mosby ed.
- Romero C., Lopez-Goni I., (1999) Applied and Environmental Microbiology 65(8), 3735-3737.
- Sanguinetti V., Pietrobello M. (1980) Atti Soc. It. Sc. Vet. 34: 327.
- van Bergen M., Dingle K., Maiden M., Newell D., van Graaf-Van Bloois L., van Putten J., Wagenaar J. (2005) J. Clin. Microbiol. 43 (12): 5888-5898.
- Vicari N., Santoni R., Vigo P.G., Magnino S. (2004). Proceedings, 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research (Ed.: Judith Deak), Budapest, Hungary, 1-4 September 2004, p. 297.

# Cheratinizzazione del rumine e BCS in pecore utilizzate nella prevenzione degli incendi



A. Malfatti<sup>1</sup>, P. Scocco<sup>1</sup>, C. Belardinelli<sup>3</sup>, R. Gatti<sup>1</sup>, F. Mercati<sup>2</sup>, C. Dall'Aglio<sup>2</sup>, A. Catorci<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scuola di Scienze ambientali Università di Camerino

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze biopatologiche ed Igiene delle produzioni animali e alimentari Università di Perugia

<sup>3</sup> Servizio di Igiene degli alimenti di origine animale ASUR 10 Camerino

**Parole chiave:** pecore, rumine, BCS, prevenzione incendi.

**INTRODUZIONE** - L'Unione Europea finanzia ricerche che prevedono l'uso di animali domestici nella prevenzione degli incendi boschivi. Una delle principali cause di innesco degli incendi boschivi nella zona dell'Appennino centrale, dove maggiormente insistono greggi di pecore, è rappresentata dalla presenza di necromassa nella zona ecotonale tra bosco e pascolo, caratterizzata da una forte copertura di *Brachypodium rupestre* (*Br. r.*), una specie erbacea alta e poco appetita dagli ovini a causa dell'elevata fibrosità e della ricchezza in silicati delle foglie. Tuttavia, quando gli animali sono costretti e in sovraccarico in recinti su zone ad alta copertura di *Br. r.* prelevano tutte le risorse foraggiere disponibili, prevenendo l'innesco degli incendi. Questa sperimentazione è volta alla determinazione della lunghezza del periodo di permanenza degli ovini su zone ad alta copertura di *Br. r.* senza influire negativamente sul loro benessere ed è stato condotto valutando le modificazioni del grado di cheratinizzazione dell'epitelio ruminale, del BCS (Body Condition Score) e del peso corporeo degli animali tenuti su un pascolo ad alta copertura di *Br. r.*

**MATERIALI E METODI** - Sono stati utilizzati due gruppi di pecore, il gruppo di controllo è stato fatto pascolare su un pascolo semi-mesofilo, mentre il gruppo sperimentale (dopo un periodo di adattamento di 4 giorni su pascolo a copertura di *Br. r.* del 30% ca.) è stato tenuto su un pascolo ad alta copertura di *Br. r.* (>60%). All'inizio della sperimentazione, dopo 10 gg e dopo 20 gg di permanenza degli animali sulle parcelle sperimentali sono stati valutati il peso degli animali (PV), il BCS ed il grado di cheratinizzazione dell'epitelio di atrio (RA) e sacco ventrale del rumine (RVS) espresso in percentuale sull'altezza totale dell'epitelio. È stata effettuata la valutazione di eventuali danni a carico delle mucose del comparto ingestivo.

**RISULTATI** - Gli animali tenuti sulle parcelle sperimentali non hanno mostrato lesioni attribuibili agli effetti dell'alimentazione su *Br. r.* né sulle labbra, né sulla lingua. Analogamente non sono state riscontrate microlesioni a livello delle mucose. Il grado di cheratinizzazione degli epiteli ruminali (Figg. 1, 2) è cambiato in misura maggiore nel gruppo sperimentale (da 17,2% a 31,7% in RA, da 20,0% a 37,3% in RVS) che nei controlli (da 17,0% a 19,5% in RA, da 20,2% a 22,1% in RVS). A partire dal secondo prelievo si verificano differenze significative ( $P < 0,001$ ) tra i gruppi.

Dopo 10 giorni di permanenza su *Br. r.* gli animali hanno presentato un decremento medio di 0,69 punti di BCS, che dopo 20 giorni è salito a 1,10 punti (Fig. 3,  $P < 0,01$  rispetto ai valori iniziali), e dopo un iniziale incremento ponderale medio di 0,83 kg, si è verificato un decremento medio di 2,62 kg (-1,79 kg nell'intero

periodo,  $P < 0,05$ ); negli animali del gruppo di controllo, nonostante un lieve (N.S.) abbassamento del valore del BCS di 0,13 punti, si è avuto un aumento ponderale medio di 0,62 kg (Fig. 4, N.S.).

**CONSIDERAZIONI** - Negli animali di controllo le minime variazioni del grado di cheratinizzazione dell'epitelio di rivestimento delle mucose ruminali evidentemente poco hanno inciso sull'efficienza di assorbimento, senza effetti apprezzabili su PV e BCS. Nel gruppo sperimentale invece, l'alimentazione su un pascolo molto fibroso e con scarso potere nutrizionale, ha determinato un notevole aumento del grado di cheratinizzazione degli epiteli, in particolare, a livello del sacco ventrale del rumine, che probabilmente attraverso una diminuzione della capacità di assorbimento, può dar ragione del calo dello stato di forma degli animali già nel primo periodo di permanenza nelle parcelle sperimentali, ancor più evidente nel secondo periodo. Poiché l'aumento della cheratinizzazione è stato rapido, mentre gli effetti sul BCS e sul PV si sono evidenziati dopo 20 giorni di pascolamento, sembra consigliabile mantenere gli animali su questo tipo di pascolo per non più di 10-15 giorni continuativi, al fine di mantenere gli animali in un soddisfacente stato di benessere.

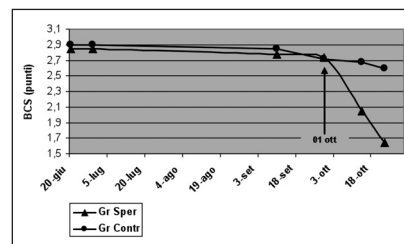
Finanziamento Regione Marche, Progetto n.16 L.R. 37/99 DGR 1234/05 "Zootecnia e prevenzione incendi".

**Rumen keratinization and BCS in sheep grazing in badland for wood fire prevention**

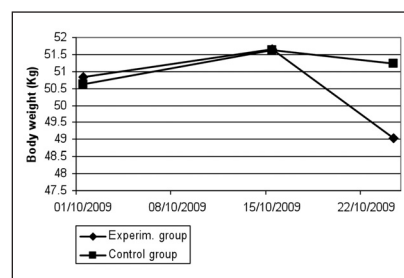
**Key words:** sheep, rumen, BCS, fire prevention.

## Bibliografia

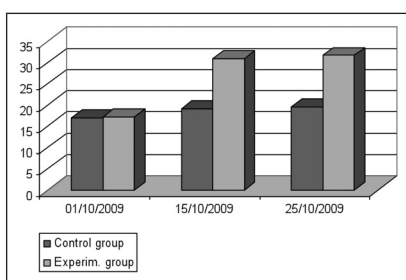
- Ceccarelli P., Scocco P., Malfatti A., Cesaretti S., Catorci A. (2009) Changes of sheep ruminal mucosae related to seasonal plant growth: when the anatomy is involved in the management of pastoral systems. *Int J Anat Embryol* 114, 72.
- Cesaretti S., Castagna S., Montenegro B., Catorci A. (2009) Zootechnical characterization of grassland vegetation in a pastoral system as a tool for biodiversity conservation: a case study of Umbria-Marches Apennines. *Inf Bot Ital* 41, 247-258.
- Hofmann R.R., Kock R.A., Ludwig J., Axmacher H. (1988) Seasonal changes in rumen papillary development and body condition in free ranging Chinese water deer (*Hydropotes inermis*). *J. Zool.*, 216, 103-117.



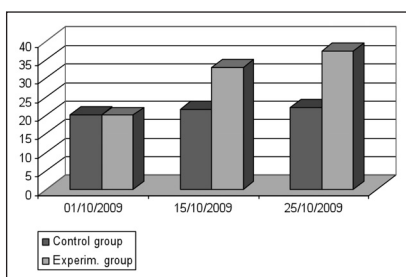
**Figura 3** - Evoluzione del BCS durante il periodo sperimentale (la freccia indica l'inizio del periodo su brachipodio).



**Figura 4** - Andamento del peso delle pecore.



**Figura 1** - Percentuale di cheratina nell'epitelio dell'atrio del rumine.



**Figura 2** - Percentuale di cheratina nell'epitelio del sacco ventrale del rumine.

# L'infezione da *Eimeria* nel capretto in allevamenti a diverso sistema di conduzione



M.T. MANFREDI, C. FRAQUELLI, M. CAVAZZONI, S. ZANZANI

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** protozoi, *Eimeria*, capretto.

**INTRODUZIONE** - I protozoi del genere *Eimeria* sono un reperto comune sia nelle capre adulte sia nei capretti, con prevalenze molto elevate (80-100%) e manifestazioni cliniche nel 50% dei soggetti esaminati (Balika-Ramisz, 1998). Spesso l'infezione è sostenuta da più specie caratterizzate da differente patogenicità. Negli allevamenti caprini lombardi l'infezione interessa il 100% delle aziende controllate e il 91,8% delle capre adulte. Tenuto conto del ruolo di questi protozoi quali agenti di diarrea negli animali giovani, lo scopo dello studio è stato quello di definire l'eziologia specifica delle emerosi nel capretto, i livelli d'infezione e l'andamento delle cariche in base all'età utilizzando come modello 3 aziende rappresentative dell'allevamento caprino nella realtà zootecnica lombarda.

**MATERIALI E METODI** - Le 3 aziende sono site in provincia di Varese: le prime due, in Val Veddasca (parte più settentrionale della provincia), allevano capre di razza Nera di Verzasca come unica razza o in promiscuità con la Camosciata e hanno carattere semiestensivo; la terza azienda è costituita solo da capre Camosciate ed è a conduzione intensiva. Complessivamente sono state campionate le feci di 109 capretti, femmine e di età variabile dalla decima alla 15ma settimana: 56 capretti (Gruppo I) provenivano dall'allevamento intensivo; 35 capretti "Nera di Verzasca" e 18 di Camosciata dagli altri due allevamenti i quali, tenuto conto dell'omogeneità di conduzione delle aziende, sono stati considerati insieme (Gruppo E). La determinazione del numero medio di oocisti/g di feci (opg) è stata effettuata mediante la tecnica FLOTAC e una soluzione di magnesio solfato (Cringoli, 2006).

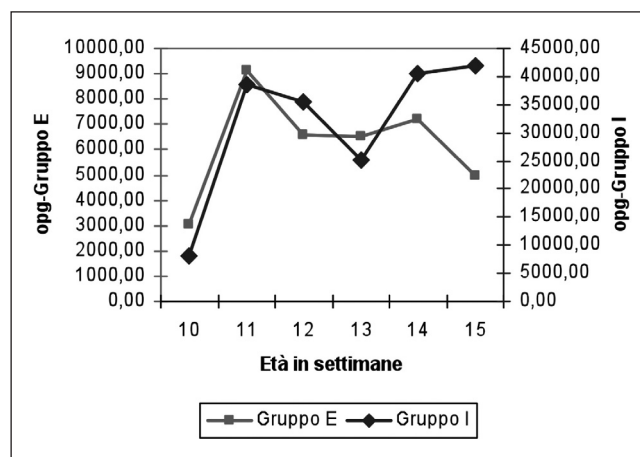
Le specie di *Eimeria* presenti sono state determinate analizzando un pool di campioni per ciascuno degli allevamenti. Le feci sono state lavate con acqua di fonte, filtrate e centrifugate più volte fino ad ottenere un sedimento abbastanza pulito. Questo materiale è stato quindi posto in incubatore alla temperatura di 27,5° C circa, con bicromato di potassio al 2% fino alla sporulazione delle oocisti presenti. A 6 giorni dall'incubazione tutte le oocisti erano sporulate; sono state concentrate mediante flottazione e identificate sulla base di chiavi morfometriche considerando le dimensioni delle oocisti e delle sporocisti, la presenza della calotta polare, del micropilo e dei residui della sporulazione, caratteristiche degli sporozoit (Eckert et al 1995). I valori di opg calcolati nei due gruppi sono stati confrontati con il test non parametrico di Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Complessivamente sono state riscontrate 7 specie di *Eimeria* (Tab. 1). Tra le specie patogene la più diffusa è risultata *E. christenseni* in entrambi i gruppi e tra quelle non patogene *E. alijevi*, soprattutto nel gruppo a conduzione intensiva (Gruppo I). In particolare, *E. christenseni* manifesta la sua caratteristica patogenicità a causa della localizzazione degli schizonti di I generazione nelle cellule endoteliali dei vasi chiliferi del digiuno e l'ileo, nella lamina propria e nei vasi linfatici.

La prevalenza di infezione è risultata molto elevata sia nei capretti provenienti dall'allevamento intensivo (100%) sia in quelli dell'allevamen-

**Tabella 2** - Escrezione di oocisti nei capretti.

Gruppi		opg Media (DS)	opg Min-max	Peso Media (Ds)
I		34014,55 (36587,14)	520 185400	15,96 1,80
	Camosciata	5676,92 (6565,02)	0 18380	16,82 4,34
E		6400,60 (9560,27)	0 45500	20,31 2,29
	Nera di Verzasca			



**Grafico 1** - Escrezione di oocisti nei capretti in funzione dell'età.

to estensivo (93%). Nel gruppo I oltre ad una maggiore prevalenza, l'escrezione di oocisti è apparsa maggiore sia come valore medio sia per quanto riguarda quello massimo (Tab. 2).

Per altro, nel gruppo I ben 13 soggetti avevano cariche  $\geq 50.000$  oocisti che è considerato il livello di opg che caratterizza la comparsa di forme di emerosi clinica (Chartier). Nel gruppo E un solo soggetto aveva una carica costituita da 45500 opg e 7 avevano cariche comprese tra 10.000 e 24.000 opg. Le cariche sono risultate statisticamente differenti tra i due gruppi (U Mann-Whitney  $p < 0,05$ ).

Il numero di opg è apparso variare anche in funzione dell'età: in entrambi i gruppi l'emissione di oocisti aumenta sensibilmente tra la decima e l'undicesima settimana. Nei capretti del gruppo I, il valore di opg raggiunge già in questo periodo dei livelli critici (Grafico 1).

## ■ *Eimeria* infection in kids from different flocks

**Key words:** protozoa, *Eimeria*, kid.

**Tabella 1** - Specie di *Eimeria* identificate negli allevamenti caprini.

	Specie non patogene	Specie patogene
Gruppo I	<i>E. caprovina</i> <i>E. alijevi</i> <i>E. aspheronica</i>	<i>E. christenseni</i> <i>E. caprina</i>
Gruppo E	<i>E. arloingi</i> <i>E. alijevi</i> <i>E. aspheronica</i>	<i>E. christenseni</i>

## Bibliografia

- Balika-Ramisz A. (1998). Studies of coccidiosis in Poland. Vet. Parasitol 81, 347-349.
- Cringoli G. (2006). FLOTAC a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. Parasitologia, 48, 381-384.
- Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P. eds (1995). Guidelines on techniques in coccidiosis research. EU, Cost 89/820.

# La RM nella diagnostica della cenurosi cerebrale ovina



M.L. MANUNTA, M.A. EVANGELISTI<sup>1</sup>, N. COLUMBANO, E. SANNA PASSINO

Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria - Sezione Clinica Chirurgica - Università degli Studi di Sassari

<sup>1</sup> Dottorato in Produzione, Riproduzione e Benessere Animale - Università degli Studi di Sassari

**Parole chiave:** *Coenurus Cerebralis*, ovino, RM, chirurgia.

**INTRODUZIONE** - La cenurosi cerebrale è una malattia ad esito letale che colpisce prevalentemente gli ovini; è sostenuta dalla forma larvale (*Coenurus cerebralis*) della parassita *Taenia multiceps*. Il ciclo solitamente è di tipo rurale: l'infestione si trasmette dal cane alla pecora e viceversa. Fino ad oggi la diagnosi in vita si è basata sull'esame neurologico che, pur caratteristico, non è patognomnico.

Dato che la terapia è esclusivamente chirurgica appare chiaro che, oggi, l'impiego della RM o della TAC costituiscono un ausilio essenziale per una adeguata pianificazione chirurgica oltreché per individuare cisti multiple. Scopo di questo lavoro è presentare gli aspetti clinici, in RM e chirurgici di due ovini affetti da cisti multiple di *Coenurus cerebralis*.

**MATERIALI E METODI** - Due ovini di razza sarda di sesso femminile di 1 anno circa di età sono stati sottoposti alla nostra attenzione a causa di una sintomatologia neurologica insorta da circa 1 mese.

Nel caso n° 1 l'esame neurologico ha evidenziato uno stato del sensorio depresso e la riduzione della reazione alla minaccia bilateralmente.

Nel caso n° 2 si poteva evidenziare uno stato del sensorio depresso e modesta atassia cerebellare evidente dopo aver tolto il potere visivo.

Gli animali sono stati sottoposti a risonanza magnetica (Paramed 0,23 T) del cranio utilizzando una bobina a due canali. Lo studio ha previsto l'esecuzione di sequenze T1W, T2W e Flair su piani sagittali, trasversali e dorsali.

**RISULTATI** - Caso n° 1: l'esame in RM ha evidenziato assottigliamento della volta cranica, 3 grosse cisti rostro tentoriali responsabili di un effetto massa sul tronco encefalico e sui ventricoli.

Caso n° 2: l'esame in RM ha evidenziato 2 cisti, una con sede rostro tentoriale destra e una di maggiori dimensioni con sede cerebellare.

Sulla base delle informazioni ottenute dalla RM è stato possibile pianificare l'intervento chirurgico preparando una breccia di piccole dimensioni nel punto in cui la ciste era più facilmente raggiungibile. Nel caso n° 1 sono state preparate 3 craniotomie del diametro di circa 0,5 cm. Nel caso n° 2 sono state confezionate 2 craniotomie, una rostrotentoriale destra e una cerebellare mediana.

Gli animali hanno presentato un immediato miglioramento della sintomatologia neurologica e sono potuti ritornare in allevamento dopo una settimana di ricovero.

**CONCLUSIONI** - Lo studio in RM ha consentito di individuare cisti multiple non diagnosticabili con il solo esame neurologico. La procedura è di rapida esecuzione, consente una precisa pianificazione dell'intervento chirurgico riducendo così il danno tissutale.

**■ MRI for the diagnosis of *Coenurus Cerebralis* in sheep**

**Key words:** *Coenurus Cerebralis*, MRI sheep, surgery.

## Bibliografia

- Bagedda G. and Muzzetto P., 1970. Astasia alla prova anottica segno di sede nella fossa posteriore nella cenurosi. Nota preliminare attinente a 9 casi sui quadri clinici ed E.E.G. pre e post operatori. La Clinica Veterinaria 93, 10, 390.
- Bagedda G., Muzzetto P., Lepori S., 1969. Tecnica neurochirurgia per via trans-occipitale nella terapia radicale della cenurosi a sede nella fossa posteriore in Ovis aries. La Clinica Veterinaria, 92, 1.
- Bagedda G., 1949 a. Rilievi sul liquido cefalo-rachidiano degli ovini. La Nuova Veterinaria, 25, 346.
- Bagedda G., Lepori S., Loverci L., Muzzetto P., 1964. L'arterio-encefalografia nella cenurosi cerebrale degli ovini. Contributo alla diagnosi di sede. Veterinaria XIII, 5.
- Bagedda G., 1949 b. Rachicentesi e sindrome umorale cefalo-rachidiana nella cenurosi cerebrale degli ovini. Zootecnica e Veterinaria, 4, 630.
- Bagedda G., 1949 c. La diagnosi di sede nella cenurosi cerebrale e cerebellare degli ovini. Studi Sassaesi 27, 343.
- Cartella I., Spadola F., Musicò M., Davì D., Costa G., Siracusano L., Cucinotta G., 2002. La craniotomia nella terapia chirurgica della cenurosi cerebrale in un campione di ovini. Summa 3, 29-36.
- Kommenou A., Argyroudis S., Giadinis N., Dessiris A., 2000. Surgical treatment of coenurosis (gid) in sheep. Veterinary Record Aug 26; 147(9):242-4.
- Loverci L., Lepori S., Muzzetto P., 1964. Immagini retinografiche nella cenurosi cerebrale e cerebellare in Ovis aries. Contributo alla diagnosi di sede. Veterinaria XIII, 339.
- Petrucci V., Del Bue M., Coda S., 1989. Recenti acquisizioni sulla cenurosi cerebrale negli agnelli: ipotesi eziopatogenetiche. Atti Società Italiana Scienze Veterinarie, XLIII, 42.
- Petrucci V. and Del Bue M., 1988. Cenurosi cerebrale in Ovis musimon (mufone). Diagnosi e terapia. Atti Società Italiana Scienze Veterinarie XLII, II, 1431.
- Skerritt G.C. and Stallbaumer M.F., 1984. Diagnosis and treatment of coenuriasis (gid) in sheep. Veterinary Record Oct 20; 115(16):399-403.
- Tirgari M., Howard B.R., Boargob A., 1987. Clinical and radiographical diagnosis of coenurosis cerebri in sheep and its surgical treatment. Veterinary Record Feb 21; 120(8A):173-8.



# Comparazione fra quadri clinici, rilievi microbiologici nel latte e altri parametri di allevamento in greggi caprine con problemi di mastite infettiva



G. MAROGNA, C. PILO, A. VIDILI, S. TOLA, G. SCHIANCHI, S.G. LEORI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"

**Parole chiave:** epidemiologia, latte, capre.

**INTRODUZIONE** - La ricerca è stata condotta su 1388 capre appartenenti a 31 allevamenti distribuiti su tutto il territorio della regione Sardegna. Nell'isola si alleva circa un quarto dell'intero patrimonio caprino dell'Italia. Il lavoro ha previsto la registrazione di dati e informazioni legate ai singoli allevamenti, una visita clinica dettagliata della mammella degli animali in lattazione con registrazione di presenza/assenza dei segni clinici ed esami microbiologici dei campioni di latte. I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica per evidenziare eventuali correlazioni esistenti.

**MATERIALI E METODI** - Gli allevamenti coinvolti nella sperimentazione sono stati scelti sulla base di riscontri delle banche dati del Laboratorio Latte dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS) che esegue mensilmente la conta delle cellule somatiche sul latte di massa di circa il 90% degli allevamenti isolani. Sono stati selezionati per essere inclusi nella sperimentazione 31 allevamenti "problema", rispondenti ai seguenti requisiti: (i) un valore di cellule somatiche (SCC) nel latte di massa sempre superiore ai  $5 \times 10^6$ /ml rilevato in almeno 5 analisi effettuate durante i due anni precedenti il nostro lavoro; (ii) persistenza del problema sanitario; (iii) disponibilità dell'allevatore a collaborare.

Le visite cliniche e il campionamento del latte sono stati eseguiti nel periodo della lattazione (gennaio e aprile 2007) su tutte le capre in mungitura presenti in allevamento al momento della visita. Di ogni allevamento sono stati registrati i seguenti dati: corpo (unico, diviso), tipologia di allevamento (estensivo, semiestensivo, intensivo), tipo di mungitura (manuale o meccanica), razza delle capre. È stato inoltre registrata l'età di ciascuna capra esaminata.

La visita clinica condotta su ciascun capo comprendeva l'esame clinico della mammella ed il controllo dell'aspetto macroscopico del latte. L'esame clinico della mammella è stato eseguito dopo completa mungitura e ha compreso il rilievo di: (i) alterazioni esterne evidenziabili mediante ispezione (pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, ascessi, rubor) e palpazione (noduli, calor, dolor, presenza di lupie), (ii) consistenza del parenchima della ghiandola mammaria, classificandolo in normale, edematoso, sclerotico e atrofico, e (iii) reattività dei linfonodi sopramammari. L'esame colturale ha previsto l'inoculo di 10 µl di latte in piastre di agar-sangue di montone al 5%, incubate a  $37 \pm 1$  °C per 24-48h. L'identificazione è stata conseguita tramite test biochimici multipli (API, bioMérieux) e i profili ottenuti sono stati interpretati con il sistema apiweb® (bioMérieux). Successivamente, anche per ovviare alle difficoltà interpretative che spesso si incontrano nell'identificazione di ceppi microbici di provenienza animale (il sistema API nasce per i germi di origine umana) e quindi per garantire una interpretazione più sicura dei risultati, sono state prese in considerazione nuove e ulteriori caratteristiche fenotipiche della batteriologia "classica": emolisi in agar sangue di montone al 5%, crescita e fermentazione in terreno Mannitol Salt Agar (MSA), produzione di coagulasi "libera" (BBL Coagulase Plasma Rabbit con EDTA, BD) e di "clumping factor" (Staphylase Test, Oxoid). Sono state anche saggiate crescita e reazioni in terreno Baird-Parker RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) Agar (Microbiol).

**RISULTATI** - Risultati significativi sono stati ottenuti comparando i rilievi clinici con la positività agli esami colturali del latte. Hanno mostrato infezione intramammaria (IMI) il 22,7% delle capre.

*Staphylococcus* spp. ammontavano al 73,5% degli isolati, *Streptococcus* spp. al 9,7% e *Mycoplasma* spp. al 4,7%. Altri generi hanno mostrato prevalenze inferiori al 3%. La presenza di *Staphylococcus aureus* nel latte è risultata significativamente associata al riscontro di pustole, ulcere, noduli e rubor nella mammella ( $p < 0,05$ ). *Staphylococcus caprae* è risultato associato alla mungitura manuale rispetto a quella meccanica, all'incremento dell'età, al riscontro di edema nella mammella e all'assenza di secreto mammario ( $p < 0,05$ ). *Staphylococcus epidermidis* è risultato associato positivamente all'incremento dell'età ( $p < 0,05$ ). *Streptococcus uberis* è risultato associato alla mungitura meccanica ed al riscontro nella mammella di consistenza atrofica e linfonodi mammari reattivi ( $p < 0,05$ ). Molte altre correlazioni hanno mostrato significatività statistica.

**CONSIDERAZIONI** - Dall'analisi mediante regressione logistica emerge che il tipo di mungitura può rappresentare un fattore di rischio per la positività alla IMI, sebbene non mostri un effetto univoco.

Infatti la mungitura meccanica appare associata ad un rischio 1,6 volte più grande di positività microbiologica generale e di 15,3 volte maggiore di infezione specifica da *Streptococcus uberis*, mentre la mungitura manuale appare associata ad un rischio 3,4 volte maggiore di infezione da *Staphylococcus caprae*. Le infezioni da *Staphylococcus aureus* e da *Staphylococcus epidermidis* non sono risultate significativamente associate a nessuna delle modalità di mungitura. I dati emersi da questo studio forniscono utili indicazioni che permettono di suggerire le modalità di esecuzione della visita clinica della mammella nella capra.

Nell'esecuzione di questa, la presenza di noduli, il riscontro di una consistenza edematosa e/o atrofica, e la reattività dei linfonodi sopramammari si dimostrano caratteri clinici associati significativamente alla IMI, e pertanto il rilevamento di uno o più di questi segni dovrebbe suggerire l'ulteriore esecuzione dell'analisi microbiologica del latte per la conferma diagnostica. Gli altri caratteri indagati non sono risultati associati significativamente con IMI, e tra questi anche alcuni segni normalmente indice di stato infiammatorio acuto. Questo potrebbe spiegarsi con il diverso tipo di azione patogena svolta dai differenti batteri responsabili di IMI. In generale i risultati presentati nel lavoro evidenziano la specificità, l'utilità e la praticità dell'esame clinico della mammella tanto da proporlo come lo strumento diagnostico più importante da affiancare all'esame microbiologico del latte.

*Ringraziamenti:* questo lavoro è stato finanziato al CRENMOC con il progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute RC IZS SA 01/05. Si ringraziano per la collaborazione la Sig.ra Antonella Barbato e i Sig.ri Auzzas Salvatore, Fiori Angelo e Farina Fabrizio.

■ Analysis of relationship among clinical signs of udder, microbiological positivity of milk and some farm parameters in dairy goat flocks with problems of infectious mastitis

**Key words:** epidemiology, milk, goats.

# Utilizzo di Fitover/O Plus® nel controllo dei nematodi in ovi-caprini in provincia di Trento



G. MINGHETTI<sup>1</sup>, A. PECILE<sup>1</sup>, E. MASIN<sup>2</sup>, S. ZANUTTO<sup>3</sup>, M. VOLANTI<sup>3</sup>,  
D. DELLAMARIA<sup>4</sup>, E. FRANCIONE<sup>4</sup>, G. FARINA<sup>4</sup>, G. CAPELLI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Fondazione Edmud Mach, San Michele all'Adige (TN)

<sup>2</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova

<sup>3</sup> Veterinari liberi professionisti

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

**Parole chiave:** ovi-caprini, nematodi gastro-intestinali, Fitover/O Plus®.

**INTRODUZIONE** - In provincia di Trento il patrimonio caprino attuale ammonta a circa 9000 capi e quello ovino a 25000. Questa tipologia di allevamento riveste un'importanza notevole nella conservazione e nella tutela del paesaggio. Gli allevamenti sono spesso delle piccole realtà a conduzione familiare di tipo estensivo in cui il pascolo rappresenta una pratica molto diffusa.

Normalmente un sistema di controllo efficace delle endoparassitosi è rappresentato da un costante monitoraggio degli allevamenti, dalla profilassi ambientale (mediante rotazione dei pascoli) e dall'impiego di farmaci antielmintici di sintesi. Questi ultimi tuttavia non possono essere utilizzati in allevamenti biologici e quindi risulta utile testare l'efficacia di possibili trattamenti antielmintici alternativi. Il presente lavoro, condotto su allevamenti ovi-caprini siti in provincia di Trento, ha testato l'efficacia di un fitoterapico (Fitover/O Plus®) sul controllo delle parassitosi gastrointestinali degli ovi-caprini.

**MATERIALI E METODI** - Il lavoro è stato condotto in tre allevamenti ovi-caprini ubicati in Val di Fiemme (a-ovini, b e c-caprini), nella primavera 2007 e in autunno-inverno 2007-2008. In entrambe le stagioni è stato prima condotto uno screening parassitologico al fine di conoscere la popolazione di nematodi gastro-intestinali. Successivamente sono stati costituiti per ciascuna azienda un gruppo di controllo (C) e uno di trattati (T), omogenei dal punto di vista dell'emissione media di upg (ANOVA,  $p > 0.05$ ). I protocolli terapeutici applicati sono stati due: 1) associazione rimedio omeopatico - farmaco fitoterapico (Fitover/O Plus®) per gli allevamenti a e b; 2) Impiego del solo fitoterapico (Fitover/O Plus®) per l'allevamento c.

Gli animali nei gruppi T/C sono stati 34/32 per il protocollo 1 e 28/26 per il protocollo 2. Entrambi i protocolli prevedevano 2 somministrazioni a distanza di 15 giorni e controlli coprologici a t+7, t+14, t+21, t+28 e t+60 giorni, prima del periodo di alpeggio. I campioni fecali sono stati raccolti a livello di ampolla rettale, conservati a temperatura di refrigerazione e sottoposti ad analisi quali-quantitative.

L'analisi statistica è stata condotta mediante l'analisi della varianza (ANOVA) e il test non parametrico di Wilcoxon per campioni appaiati. Inoltre è stata testata l'efficacia del trattamento mediante la formula ideata da Wood et al. (1995).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Lo screening parassitologico pre-trattamento nelle due stagioni considerate ha messo in evidenza la presenza di nematodi gastro-intestinali nella quasi totalità degli animali testati. I parassiti rilevati sono stati: strongili gastro-intestinali, Strongyloides, Nematodirus, Skrjabinema, Trichuris, cestodi, coccidi e strongili bronco-polmonari. La maggior parte dei capi presentava una carica parassitaria compresa nell'intervallo tra <50-500 u.p.g.

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti nelle 3 aziende, impiegando i due diversi protocolli terapeutici.

In tutte e 3 le aziende non sono state rilevate differenze significative nell'emissione media di upg per nematodi gastro-intestinali nel loro insieme e per ogni genere separatamente fra i gruppi trattati e controllo.

Il presente studio ha confermato l'ampia diffusione dei nematodi gastro-intestinali negli allevamenti ovi-caprini (Cabaret et al., 2002). L'utilizzo di farmaci antielmintici di sintesi ha importanti limitazioni dovute a, farmacoresistenza, impatto ambientale e tossicità per gli animali. Da qui la necessità di impiego di molecole alternative, soprattutto in aziende a conduzione biologica: i risultati ottenuti dal presente lavoro hanno confermato quanto ottenuto da precedenti studi circa la mancata efficacia dell'impie-

**Tabella 1** - Valori di upg medie di nematodi nelle feci degli animali trattati e nei controlli, dei diversi allevamenti.

	Gruppi	N. capi	Numero nematodi (upg) rilevati dopo trattamento				
			T+7	T+14	T+21	T+28	T+60
Primavera 2007							
a	T	7	357,14	235,71	654,29	471,43	103,57*
	C	6	729,17	638,33	508,33	1141,67	345,83*
b	T	9	725,00	436,11	550,00	591,67	319,44
	C	9	661,11	435,00	405,56	518,75	434,38
c	T	16	543,13	493,75	866,67	625,00	589,06
	C	16	690,63	448,44	757,81	378,13	493,33
Autunno - Inverno 2007-2008							
a	T	9	ne	107,44	116,67	118,75	150,00
	C	8	ne	106,25	131,25	134,38	187,50
b	T	9	177,78*	658,33	525,00	927,78	638,89
	C	9	419,44*	575,00	925,00	511,11	602,78
c	T	12	560,42	407,25*	664,58	941,67	563,64
	C	10	312,50	116,67*	372,50	442,50	295,00
t+n = numero di giorni dopo ultimo trattamento.							
Allevamenti a e b: protocollo 1; allevamento c: protocollo 2 - * = ANOVA p>0.05.							

t+n = numero di giorni dopo ultimo trattamento.

Allevamenti a e b: protocollo 1; allevamento c: protocollo 2 - \* = ANOVA  $p > 0.05$ .

go di tali molecole per la riduzione dell'escrezione delle uova di nematodi gastro-intestinali (Cabaret et al., 2002). Ora sarà però interessante valutare come l'omeoterapia e la fitoterapia possano influenzare positivamente la resilienza degli animali migliorandone la risposta immunitaria, come già valutato in precedenti lavori (Del Francia F. et al., 2000).

*Ringraziamenti: questo studio è stato finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, programma di attività per la valorizzazione dei prodotti biologici.*

## ■ Use of Fitover/O Plus® in controlling small ruminants gastrointestinal nematodes in the Province of Trento

**Key words:** small ruminants, gastrointestinal nematodes, Fitover/O Plus®.

## Bibliografia

- Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Ducan J.L., Kassai T., Malone J.B. Jr., Pan-chavich J.A., Reincke R.K., Slocum O., Taylor S.M., Vercruysse J. 1995, World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) second editions of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminant (bovine, ovine, caprine), Vet. Par.; 58: 181-213.
- Cabaret J., Bouilhol M., Mage C. 2002, Managing helminths of ruminants in organic farming, Vet. Res.; 33: 625-640.
- Del Francia F., Tambini P., Caviglioli M., Parenti C. 2000 - Allevamento ovino a indirizzo biologico, Atti del convegno: allevamento ovino biologico e veterinaria omeopatica - Asciano, 6 giugno 2000: 13-19.

# Prova di svezzamento precoce dell'agnello di razza Comisana: primi risultati



V.M. MORITTU<sup>1</sup>, G. NEGLIA<sup>2</sup>, G. TARANTINO<sup>1</sup>, P. ROSSI<sup>2</sup>, G. CAMPANILE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Medicina Sperimentale e Clinica, UNICZ

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, UNINA

**Parole chiave:** Comisana, agnello, svezzamento precoce.

**INTRODUZIONE** - Nell'allevamento ovino da latte di tipo estensivo, molto diffuso nelle regioni del meridione d'Italia, lo svezzamento dell'agnello viene praticato al raggiungimento del peso di macellazione. Per la razza Comisana, secondo le richieste del mercato (Gambacorta *et al.*, 2005), esso è pari a circa 10 kg di PV e viene raggiunto a 5-6 settimane di età. L'inizio della mungitura, pertanto, ha luogo non prima di 30-40 giorni dall'agnellatura. Con il presente studio si è inteso valutare la fattibilità tecnica e la convenienza economica di una tecnica di svezzamento precoce e graduale applicata a partire dal 12° giorno di vita dei redi.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata svolta nel periodo novembre-dicembre 2009 presso un allevamento estensivo di ovini di razza Comisana situato in Soveria Simeri (prov. CZ). Per la ricerca sono stati arruolati 12 agnelli di entrambi i sessi, nati da parto singolo e da madri clinicamente sane e omogenee per età e per ordine di parto (2° o 3° parto). Al 4° giorno di vita ( $t_4$ ), i soggetti sono stati pesati ed assegnati con criterio casuale ai due gruppi: svezzamento precoce (SP,  $n = 6$ ); controllo (C,  $n = 6$ ). La prova è durata 42 giorni e si è conclusa con la macellazione di tutti gli animali.

**Stabulazione.** Fino agli 11 giorni di vita ( $t_{11}$ ), gli animali sono stati ricoverati all'interno di un capannone prefabbricato, in recinto dotato di lettiera in paglia. Nel periodo  $t_{12}$ - $t_{42}$  i gruppi sono stati separati e trasferiti all'aperto in due appositi recinti con fondo in terra battuta ricoperto di paglia, protetti da tettoia in lamiera ondulata e dotati ciascuno di mangiatoia e di abbeveratoio a vasca.

**Alimentazione.** Gli adulti di entrambi i gruppi ricevevano una dieta costituita da 600 g/capo/giorno di concentrato (Tab. 1) somministrato in due pasti giornalieri e da fieno misto sulla/avena *ad libitum*. Gli agnelli seguivano un regime alimentare differente in funzione del gruppo:

- Gruppo C: intera produzione latte delle madri a disposizione per tutta la durata della prova ( $t_0$ - $t_{41}$ ), fieno e acqua a volontà.
- Gruppo SP: come C fino a  $t_{11}$ . Da  $t_{12}$  e fino a  $t_{22}$ , durante il giorno (7.30:17.30), venivano separati dalle madri e ricevevano mangime complementare per agnelli in svezzamento (Tab. 1), fieno e acqua a volontà. Dopo le ore 17.30, ovvero al termine dell'unica mungitura giornaliera, venivano ricongiunti alle madri. Da  $t_{23}$  e fino a  $t_{41}$ , la dieta era esclusivamente solida e l'intera produzione latte veniva prelevata con 2 mungiture giornaliere (ore 7.30; ore 17.00).

La stima delle prestazioni produttive *infra vitam* è stata effettuata sugli agnelli mediante registrazione settimanale del consumo di mangime (gruppo SP) e degli accrescimenti ponderali (entrambi i gruppi). Per il gruppo SP sono stati rilevati i quantitativi giornalieri di latte munto nonché la composizione chimica del latte di massa ad intervalli setti-

**Tabella 1** - Analisi centesimale dei mangimi per ovini in lattazione (Pecore) e per agnelli in svezzamento (Agnelli).

Analisi chimica s.t.q.	Pecore	Agnelli
Umidità	12,9%	13%
Proteina grezza	22%	24%
Estratto etereo	5%	7,7%
Fibra grezza	8,5%	12%
Ceneri	9,3%	8,33%

manali ( $t_{13}$ ,  $t_{21}$ ,  $t_{27}$ ,  $t_{34}$ ,  $t_{41}$ ). Per lo studio dei parametri di macellazione, inoltre, tutti gli agnelli sono stati sottoposti a 12 ore di digiuno pre-macellazione e sacrificati a 42 giorni di vita. Detti parametri sono stati rilevati secondo le metodiche ASPA (ASPA, 1989) e la qualità delle carcasse è stata valutata secondo la Tabella comunitaria per la classificazione degli agnelli leggeri (Reg. CE n. 2137/92, Reg. CE n. 461/93). I dati dei due gruppi sono stati elaborati con il software GraphPad InStat® ed è stato applicato il test t di Student per il confronto delle medie.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Lo schema di svezzamento applicato ha rallentato sensibilmente gli accrescimenti del gruppo SP a partire dai 34 giorni di età (Fig. 1), mentre il peso degli agnelli C risulta in linea o superiore rispetto a quello osservato da altri Autori (Gambacorta *et al.*, 2005; Maiorano *et al.*, 2009). Il consumo alimentare del gruppo SP nel periodo  $t_{12}$ - $t_{41}$  (Fig. 2) è stato di complessivi 29 kg di pellettato (161 g/capo/d). L'ingestione è risultata molto limitata nel periodo  $t_{12}$ - $t_{22}$  durante il quale i redi ricevevano il latte nelle ore notturne, per poi aumentare progressivamente e in maniera considerevole, come osservato da Maiorano *et al.* (2009), nei periodi corrispondenti allo svezzamento completo.

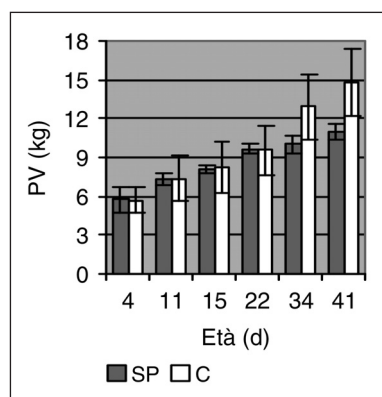
La valutazione dei parametri di macellazione ha evidenziato un peso della carcassa a caldo significativamente superiore per il gruppo C ( $8,1 \pm 1,6$  kg vs  $5,4 \pm 0,3$  kg;  $P=0,0043$ ) e analogo risultato per la resa netta a caldo ( $62,1 \pm 0,8\%$  vs  $58,6 \pm 0,9\%$ ;  $P=0,0022$ ). La valutazione delle carcasse del gruppo C ha collocato il 33% delle stesse nella categoria A ( $\leq 7$  kg) e le restanti nella categoria B (7,1-10kg), mentre quelle del gruppo SP sono risultate tutte di categoria A. Per entrambi i gruppi le carcasse sono state giudicate di prima qualità. L'anticipo dell'entrata in mungitura delle 6 pecore del gruppo SP, ha consentito di ricavare un totale di 163 litri di latte (composizione media: grasso%  $6,9 \pm 0,78$ , proteine%  $5,4 \pm 0,36$ , lattosio%  $4,8 \pm 0,07$ ). L'analisi economica ai prezzi correnti dei fattori (mangime, carni, latte), ha rivelato un aumento del guadagno grazie allo svezzamento anticipato (SP = 32,2 €/capo, C = 28,4 €/capo) e sembrerebbe incoraggiare verso un anticipo dell'entrata in mungitura delle pecore in accordo con quanto stabilito da Palazzo *et al.* (2005). Ulteriori verifiche, attualmente in corso, riguarderanno la valutazione dell'impatto di tale tecnica sul benessere animale.

## ■ Early weaning of Comisana lambs: first results

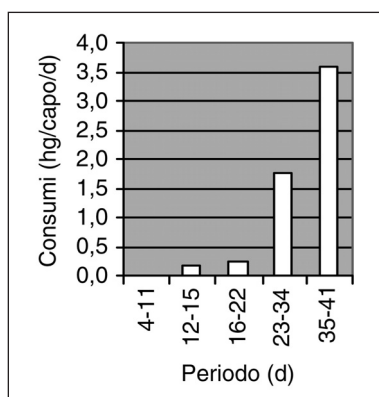
**Key words:** Comisana, lamb, early weaning.

## Bibliografia

- Gambacorta E., Marsico D., Perna A., Cosentino C., Cosentino E. (2005). Atti XIII Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum. - Bari - Italia.  
 Maiorano G., Ciarlariello A., Cianciullo D., Roychoudhury S., Manchisi A. (2009). Meat Science; 83(3):577-583.  
 Palazzo M., Pizzo R., D'Alessandro A.G., Casamassima D. (2005). Atti XIII Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum. - Bari - Italia.



**Figura 1** - Peso vivo degli agnelli (medie  $\pm$  dev. st.). \* =  $P < 0,05$ .



**Figura 2** - Consumo alimentare del gruppo SP.



# Tipizzazione molecolare di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da latte ovino



B. PATERNESI, M. CAGIOLA, A. VALIANI, S. BENDA, G. CURINA, P. MAZZONE, K. FORTI, A. DE GIUSEPPE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

**Parole chiave:** Enterotossine stafilococciche, mastite ovina, multiplex-PCR.

**INTRODUZIONE** - *Staphylococcus aureus* è il principale agente responsabile di mastiti cliniche e subcliniche nei ruminanti. Può contaminare gli alimenti di origine animale ed in particolare i prodotti lattiero caseari. È infine ritenuto un importante agente causale di tossinfezioni alimentari<sup>1</sup>. La profilassi delle mastiti stafilococciche, in particolare nella specie ovina, si basa sull'uso di autovaccini e presidi immunizzanti commerciali che però, a seguito della riscontrata molteplicità di sierovarianti circolanti di *S. aureus*, si sono dimostrati scarsamente efficaci. Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di verificare la variabilità genetica tramite caratterizzazione biomolecolare dei ceppi di *S. aureus* isolati nei nostri laboratori e responsabili di mastiti nella specie ovina. Tale tipizzazione si è rivelata utile sia ai fini epidemiologici, in quanto è stato possibile valutare la distribuzione territoriale dei ceppi isolati, sia ai fini profilattici per una possibile inclusione degli stessi nella formulazione di un presidio immunizzante specifico.

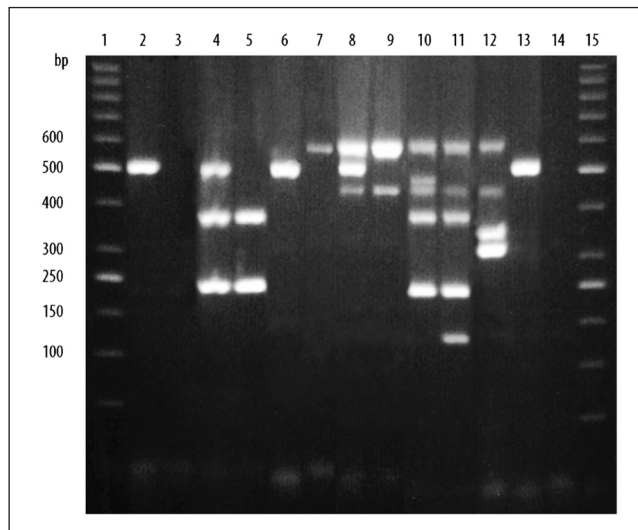
## MATERIALI E METODI

**Ceppi batterici ed estrazione del DNA.** Sono stati analizzati 241 ceppi di *S. aureus* isolati da latte prelevato ad ovini con quadri clinici di mastite. Sono stati utilizzati, come controllo positivo del sistema d'amplificazione, i ceppi di riferimento ATCC19095 (specifico per le enterotossine SEC, SEH, SEG, SEI, SEL), ATCC 23235 (SED, SEG, SEI, SEJ), ATCC 700699 (SEA, SEC, SEG, SEI, SEL), mentre è stato impiegato come controllo negativo, un ceppo di *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Per l'estrazione del DNA genomico sia i ceppi di campo che gli ATCC sono stati coltivati in BHI (Brain Heart Infusion Broth) ed incubati a 37°C per 24 h. Un millilitro di brodcultura è stato centrifugato per 2 min a 17,500 X g e sottoposto ad estrazione del materiale genomico utilizzando il kit QIAamp Mini DNA (QIAGEN).

**Primers ed amplificazione del DNA batterico.** Per la caratterizzazione biomolecolare dei ceppi mastitogeni di *S. aureus*, è stata messa a punto una multiplex-PCR utilizzando una serie di primers specifici per le enterotossine SEA, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL<sup>2</sup>. Come controllo di estrazione del DNA genomico è stata impiegata una coppia di primers in grado di amplificare il target specifico per l'rRNA ribosomiale 23S dello *S. aureus*. L'amplificazione del DNA è stata effettuata con una denaturazione iniziale a 95° per 5 min, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94° per 1 min., annealing a 56° per 1 min. ed estensione a 68° per 1 min. Al completamento della reazione è stato effettuato uno step di estensione finale a 72° per 7 min. Ogni campione è stato processato in doppio, cioè in presenza o in assenza dei primers specifici per il gene 23S.

**RISULTATI** - Dai risultati preliminari ottenuti durante la messa a punto della multiplex-PCR, è emerso che il target di alcune enterotossine, sempre presenti sia nei ceppi batterici ATCC che nei campioni oggetto di studio, non era amplificato quando la reazione veniva eseguita in presenza dei primers del gene 23S (Fig. 1: lane 6 e 7). Per questo motivo ogni campione è stato processato in doppio al fine di confermare la presenza del DNA estratto. Dei 241 ceppi mastitogeni di *S. aureus* oggetto di studio, 186 (77,1%) sono risultati positivi ad almeno un tipo di enterotossina. 143 campioni (59,3%) hanno espresso entrambe le enterotossine SEC e SEL, l'enterotossina SEI è stata individuata in 39 campioni (16,2%), mentre solo 4 ceppi (1,6%) sono risultati positivi alla SEG sempre associata alla SEI<sup>3</sup> (Fig. 1). Tutti i ceppi sono risultati negativi alle enterotossine SEA, SED, SEJ, SEH (dati non illustrati).

**CONSIDERAZIONI** - Dall'analisi dei dati ottenuti dalla ricerca è emerso che i ceppi di *S. aureus* circolanti nel territorio di nostra competenza e responsabili di mastite ovina presentano geni codificanti principalmente le enterotossine SEC e SEL, seguite dalla SEI e dalla SEG. Tali informazioni confermano una notevole variabilità genotipica dei ceppi *S. aureus* isolati. Dal momento che lo sviluppo del fenomeno dell'antibiotico-resistenza ha determinato un rinnovato interesse nei



**Figura 1** - Multiplex-PCR su alcuni ceppi di *S. aureus*. Lane 1: marker 50bp. Lane 2 e 3: *S. aureus* non enterotossico processato in presenza o assenza dell'amplificato del gene 23S (499bp). Lane 4 e 5: *S. aureus* positivo per le enterotossine SEL (244 bp) e SEC (371bp) in presenza o assenza dell'amplificato del gene 23S. Lane 6 e 7: *S. aureus* positivo per l'enterotossina SEI (529 bp) in presenza o assenza dell'amplificato per il gene 23S. Lane 8 e 9: *S. aureus* positivo per l'enterotossina SEG (432 bp) e SEI (529 bp) in presenza o assenza dell'amplificato del gene 23S. Lane 10: ATCC19095. Lane 11: ATCC700699. Lane 12: ATCC 23235. Lane 13: *S. epidermidis*. Lane 14: controllo negativo. Lane 15: marker 50bp.

confronti della vaccinazione come principale mezzo di prevenzione e lotta alle mastiti ovine da *S. aureus*<sup>4</sup>, è ipotizzabile l'allestimento di un presidio immunizzante che includa nella formulazione i genotipi di *S. aureus* maggiormente diffusi nel territorio. Pertanto, a tal fine dovranno essere sviluppate indagini immunologiche che confermino la variabilità antigenica dei genotipi analizzati.

## Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from ovine milk

**Key words:** Staphylococcal enterotoxins, ovine mastitis, multiplex-PCR.

## Bibliografia

- Vautour E.; Cockfield J.; Le Marechal C.; Le Loir Y.; Chevalier M.; Robinson D.A.; Thierry R.; Lindsay J. "Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus sub-clinical mastitis in dairy sheep flock" (2009). Vet. Res; 40:56.
- Cremonesi P.; Luzzana M.; Brasca M.; Morandi S.; Lodi R.; Vimercati C.; Agnellini D.; Caramenti G.; Moroni P.; Castiglioni B. "Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strain isolated from milk and dairy products" (2005). Molecular and Cellular Probes; 299-305.
- Identification and characterization of Staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus* (1998). Infection and Immunity; 66:3337-3348.
- Tollersrud T.; Nørstebø P.E.; Engvik J.P.; Reitan L.J.; Lund A. "Antibody response in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants (2002). Vet. Res. Comm. 26:587-600.



# Rilievi clinici in ovini infettati sperimentalmente con *Anaplasma ovis*



F. PETAZZI<sup>1</sup>, I. ALLOGGIO<sup>2</sup>, G. RUBINO<sup>1</sup>, G. BRAMANTE<sup>2</sup>, E. PIERAGOSTINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dip. DISPEZ - Università di Bari

<sup>2</sup> Dip. PROGESA - Università di Bari

**Parole chiave:** anaplasmosi, Suffolk, Comisana, risposta alla malattia.

**INTRODUZIONE** - Nell'ambito del progetto SELMOL finanziato dal MIPAAF, razze mediterranee e razze nordiche sono state utilizzate come modello per investigare la risposta genetica alle malattie da zecche. In particolare una ricognizione sul territorio ci ha portato a rivolgere la nostra attenzione all'anaplasmosi ed all'uopo sono stati individuati soggetti portatori da utilizzare ai fini di una infezione sperimentale di soggetti caratterizzati da genotipi diversi. L'*Anaplasma* (A.) *ovis* può provocare patologie lievi o gravi a seconda della suscettibilità individuale e/o della razza. Precedenti lavori condotti in Puglia hanno documentato la scarsa suscettibilità delle razze mediterranee nei confronti delle MTZ (Pieragostini, Petazzi, 1999). Questo fenomeno, tuttavia non è mai stato oggetto di uno studio mirato teso alla quantificazione della risposta nei confronti di uno specifico patogeno, né una valutazione delle differenze rispetto ad altre razze di origine nordica. Questo lavoro contribuisce alle conoscenze di suscettibilità comparata all'anaplasmosi, riportando i risultati di un confronto tra ovini di razza Suffolk e Comisana basato sulla valutazione delle variazioni del quadro ematologico e dei sintomi clinici a seguito di un'infezione sperimentale con A. *ovis*.

## MATERIALI E METODI

**Animali.** Sedici agnelli di circa 6 mesi di età, selezionati in base alla razza e equamente divisi tra Suffolk e Comisana, sono stati stabulati presso la sezione di Clinica Medica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari. **Infezione sperimentale.** L'A. *ovis* è stato isolato da una pecora splenectomizzata, infettata naturalmente al pascolo. La densità della parasitemia è stata stimata su strisci del *buffy coat* ed espressi come percentuale di globuli rossi (RBC) parassitati. Al momento del picco della parasitemia nel soggetto donatore (36% di RBC), sono stati prelevati 400 ml di sangue ed a ciascuno agnello sono stati inoculati 25 ml di sangue infetto.

**Rilievi clinici.** Per 8 settimane dall'infezione, gli agnelli sono stati sottoposti a controllo quotidiano che prevedeva un esame clinico obiettivo ed il controllo della temperatura rettale. Campioni di sangue sono stati raccolti bisettimanalmente durante il periodo dell'osservazione. I parametri ematologici sono stati valutati mediante un analizzatore automatico.

**Dati e statistica.** I parametri ematologici considerati sono: ematocrito (Hct) emoglobina (Hb) numero di RBC volume eritrocitario (MCV) concentrazione emoglobinica corpuscolare (MCH) concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) numero dei globuli bianchi (WBC). I dati sono stati sottoposti al Wilcoxon Test del pacchetto R (R version 2.11.0, 2010).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - In Tabella 1 sono riportati i rilievi clinici registrati per le due razze a confronto ed espressi come: i) periodo di incubazione (P.I.) della malattia a partire dal giorno dell'infezione sperimentale; ii) picco di temperatura raggiunto (P.T.); iii) decremento percentuale del valore ematocrito (D.P. HCT); iv) decremento percentuale dei grammi di emoglobina per decilitro di sangue (Hb%); v) decremento percentuale dei numero dei globuli rossi (D.P. GR). Significative ( $P < 0.01$ ) sono le differenze nel tempo di incubazione e nel picco di temperatura. In Tabella 2 sono riportati i confronti tra le medie dei parametri ematologici registrati per le due razze: a) in condizioni normali al momento dell'infezione (P.E.), b) durante la fase di recupero a partire dalla fase acuta della malattia (FA) e c) dopo due settimane (FR).

**Tabella 1** - Rilievi clinici registrati per le due razze a confronto ed espressi come: i) periodo di incubazione della malattia inteso come giorni a partire dal giorno dell'infezione sperimentale (P.I.), ii) picco di temperatura raggiunto (P.T.), iii) decremento percentuale del valore ematocrito (D.P. HCT), iv) decremento percentuale dei grammi di emoglobina per decilitro di sangue, v) decremento percentuale dei numero dei globuli rossi (D.P. GR).

Razza	P.I. (gg)	P.T. C°	D.P. HCT (%)	D.P. Hb (%)	D.P. GR (%)
Comisana	38.83 <sup>A</sup>	39.89 <sup>A</sup>	57.73	56.94	55.86
Suffolk	24.17 <sup>B</sup>	40.54 <sup>B</sup>	65.39	60.17	60.25

**Tabella 2** - Confronto tra le medie dei parametri ematologici (P.E.) registrati per le due razze: a) in condizioni normali, b) durante la fase di recupero a partire dalla fase acuta (FA) della malattia, c) dopo due settimane (1<sup>a</sup> FR).

	P.E.	Valori normali	Valori FA	Valori FR
Comisana	Hct (%)	35.00±2.39 <sup>a</sup>	11.29±2.66	26.23±1.66 <sup>a</sup>
	Hb(%)	12.59±0.96 <sup>a</sup>	4.70±0.48	8.55±0.68 <sup>a</sup>
	RBC	11.85±1.34	5.05±0.76	6.86±0.70
	MCV	29.74±2.34 <sup>A</sup>	29.14±3.18 <sup>A</sup>	38.38±3.20 <sup>A</sup>
	MCH	10.68±0.72 <sup>A</sup>	9.37±1.12 <sup>A</sup>	12.50±0.93 <sup>A</sup>
	MCHC	35.86±1.30	32.14±0.41	32.53±1.04
Suffolk	WBC	10.13±2.67	7.50±1.44	10.43±2.89 <sup>a</sup>
	Hct (%)	31.88±2.75 <sup>b</sup>	12.71±2.66	23.90±2.28 <sup>b</sup>
	Hb(%)	11.45±0.98 <sup>b</sup>	4.69±0.73	7.70±0.69 <sup>b</sup>
	RBC	12.48±1.18	4.49±0.84	7.23±0.97
	MCV	25.01±1.02 <sup>B</sup>	32.29±1.58 <sup>B</sup>	33.25±1.98 <sup>B</sup>
	MCH	9.20±0.34 <sup>B</sup>	10.47±0.56 <sup>B</sup>	10.71±0.64 <sup>B</sup>
	MCHC	36.79±0.95	32.53±1.22	32.26±0.80
	WBC	8.55±1.09	10.90±2.42	7.56±1.12 <sup>b</sup>

I dati di normalità (Tab. 2, colonna P.E.) evidenziano differenze nel quadro ematologico delle due razze, quello della Comisana essendo caratterizzato da valori di RBC *minus* varianti, ma con eritrociti più grandi (MCV) e con maggiore contenuto di emoglobina (MCH) e confermando quanto già osservato nel confronto tra le razze nord europee e gli ovini autoctoni pugliesi (Pieragostini et al 1994; 2005). Accanto ai valori riportati, va annotato che l'andamento clinico della malattia (Tab. 2, colonna F.A.), con le dovute eccezioni, si è dimostrato estremamente diverso, obbligando gli scriventi ad intervenire con tetracicline, con sterilizzazione parassitaria (interrompendo drasticamente la evoluzione della malattia) e trasfusioni in sette soggetti Suffolk su otto, tutti in stato di grave prostrazione, iporeattività ed ipotermia, onde evitarne il decesso. Non così nei Comisani per i quali non si è reso necessario alcun intervento se non per un soggetto; questi ultimi, già dopo circa due settimane, mostravano una fase di recupero estremamente più efficiente rispetto ai Suffolk (Tab. 2, Colonna F.R.) come risulta dal confronto tra gli indici eritrocitari indiretti quali MCV ed MCH ( $P < 0.01$ ). Confermata la maggiore capacità di resistere alla fase acuta di malattia nella razza autoctona, resta la valutazione del perché, non quello ancestrale, ma quello reale immediato. A questo riguardo il dato di sintesi sembra risiedere nel fatto che, sebbene nei soggetti alloctoni gli eritrociti di partenza siano di più (Tab. 2, colonna P.E.), la risposta immunologica (quale opsonizzazione degli eritrociti o come azione depravativa della milza) è infinitamente più violenta, portando rapidamente gli stessi ad una situazione di carenza della efficienza ematica proporzionalmente molto più grave proprio per la rapidità nell'instaurarsi (Tab. 1, colonna 1).

## ■ Clinical findings in sheep after experimental infection with *Anaplasma ovis*

**Key words:** anaplasmosis, Suffolk, Comisana, response to the disease.

## Bibliografia

- Pieragostini, E., Dario, C., Bufano, G. (1994) Small Rum. Res. 13, 177-185.  
 Pieragostini, E.; Petazzi F. (1999) Parassitologia. 41 Suppl 1, 89-94.  
 Pieragostini, E., Rubino, G., Bramante, G., Rullo, R., Petazzi F., Caroli A. (2006) J. Anim. Breed. Genet., 123, 122-30.  
 R version 2.11.0 (2010-04-22) Copyright (C) 2010. The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0.

# Identificazione elettronica e retinografie per caratterizzare ovini di razza Sarda



W. PINNA<sup>1</sup>, M.G. CAPPAL<sup>1</sup>, G. NIEDDU<sup>1</sup>, L. MACCIOTTA<sup>2</sup>, V. PETRUZZI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Produzioni Animali, Dipartimento di Biologia Animale

<sup>2</sup> Sezione di Radiologia, Dipartimento di Patologia e Clinica Chirurgica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari

**Parole chiave:** RFID (identificazione a radio frequenza); EID (identificazione elettronica); RTn (retinografia).

**INTRODUZIONE** - L'identificazione degli animali presenta alcune peculiarità a seconda delle differenti specie, sia per quanto concerne la normativa comunitaria, sia per le esigenze pratiche degli operatori. I vantaggi offerti dall'identificazione elettronica degli animali mediante tecnologia RFID sono ben note. L'opportunità di potenziare la tecnologia RFID implementandola in un sistema integrato con altre tecnologie innovative può rappresentare un'ulteriore evoluzione del sistema. Con tali prospettive, ci è sembrato interessante valutare la possibilità di impiegare la retinografia per l'identificazione individuale degli animali, derivante dalle esperienze della clinica oftalmologica, in funzione della forte individualità dell'impronta retinica accoppiandola al codice elettronico identificativo di ciascun animale. In questo lavoro, riportiamo la nostra esperienza di abbinamento dell'identificazione elettronica con le peculiarità del disegno vasale del fondo dell'occhio, in differenti soggetti per una forma di identificazione individuale integrata EID + RTn (retinografia), cioè utilizzando il dato elettronico del codice del transponder con un dato di matrice biologica del singolo soggetto.

**MATERIALI E METODI** - Un totale di 24 ovini di razza sarda a vello bianco (n = 10) e a vello nero (n = 14) sono stati identificati elettronicamente mediante l'impiego di transponder passivi con tecnologia Half Duplex (32.5x3.8 mm, ISO 11784-11785 Tiris 32 mm) applicati con boli ceramici endoruminali (75 g. 70x21 mm RUMITAG bolus®). Su tutti gli animali, contenuti da un operatore, senza bisogno di sedazione, è stata eseguita una media di 12 retinografie (6 scatti per occhio), dopo un'adeguata dilatazione pupillare mediante 2-3 gocce di tropicamide (Visumidriatic 0.5%). La lettura e la registrazione del codice elettronico individuale (EIC) del transponder sono stati effettuati a mezzo di lettore portatile di transponder (lettura statica) e mediante lettura con antenna fissa in corridoio di lettura (lettura dinamica). Le retinografie sono state eseguite con retinografo Kowa RC-2 (film Kodak elitechrome, 100 asa). Ciascuna immagine retino grafica è stata esaminata visivamente e analizzata per le caratteristiche dei vasi retinici in termini di numerosità, decorso, distribuzione e relazioni topografiche. Le immagini retinografiche di ciascun occhio del singolo soggetto e il codice elettronico del transponder applicato all'animale sono state riportate su databank in formato digitale.

**RISULTATI** - L'impiego dell'identificazione elettronica su base RFID ha notevolmente agevolato la creazione di un database in formato digitale consentendo di integrare in maniera univoca il codice elettronico individuale del transponder (EIC) di ciascun animale con l'immagine fornita dalla retinografia bioculare di ciascun capo. Le singole immagini retino grafiche acquisite ed esaminate per ciascun occhio si caratterizzano singolarmente per emergenza, decorso e distribuzione delle rispettive relazioni topografiche dei vasi del fondo dell'occhio. Nell'arco di un triennio, l'analisi cronologica seriale ha consentito di confermare per ciascun capo un proprio profilo retinico individuale binoculare e, nei casi considerati, la definizione del profilo retinico è risultata costan-

te nel tempo, da poter eventualmente considerare come *fingerprint*, qualora venisse confermato da ulteriori acquisizioni raccolte dall'estensione delle indagini ad un più ampio campione di soggetti.

**CONCLUSIONI** - L'integrazione delle due tecnologie ai fini anagrafici per l'identificazione individuale dei singoli capi offrono un primo interessante *integrated labelling RFID + biological trait model*, con ampio margine di successiva elaborazione dell'immagine computerizzata.

## Electronic identification and retinographies to characterize Sarda breed sheep

**Key words:** RFID (Radio frequency identification); EID (electronic identification); RTn (retinography).

## Bibliografia

- Caja G., Conill C., Nehering R., Ribó O. (1999). Development of a ceramic bolus for the permanent electronic identification of sheep, goat and cattle. *Comput. Elect. Agric.* 24 pp 45-63.
- Conill C., Caja G., Nehering R., Ribó O. (1998). Evaluation of main factors affecting the efficiency of passive injectable transponders as a method of electronic identification in cattle. *Journal of Animal Science* 76 (suppl. 1): 271 (Abstr.).
- Gazzetta Ufficiale Delle Comunità Europee N. L 5/8 del 09/01/2004. Regolamento CE 21/2004.
- International Standardisation Organisation (ISO) (1994). Draft International Standard (DIS), ISO/DIS 11784. Agricultural equipment. Radiofrequency identification of animals. Code structure.
- International Standardisation Organisation (ISO) (1995). Draft International Standard (DIS), ISO/DIS 11785. Agricultural equipment. Radiofrequency identification of animals. Technical concept.
- Loverci L., Lepori S., Muzzetto P. Immagini retino grafiche delle Coenurosi cerebrale e cerebellare in Ovis aries. Contributo alla diagnosi di sede. *Veterinaria XIII*, 1964.
- Petruzzi V., Del Bue M. Coenurosi cerebrale in Ovis musimon. Diagnosi e terapia. *Atti SISVET*, 1988.
- Pinna W., Sedda P., Delogu G., Moniello G., Sionis G.F., Solinas I.L. (2004). Identificazione Elettronica Nell'allevamento Ovino da Latte. *Atti XIV Congresso Nazionale SIPAOC*, Siena (Si) 28 Sett - 2 Ottobre.
- Pinna W., Cappai M. G., Sedda P., Garau G., Sfuncia A., Bitti M., (2006). Anagrafe ovina: identificazione elettronica (EID) vs tatuaggio auricolare in agnelli di razza sarda. *Atti S.I.P.A.O.C.*, 25-28 Oct.
- Pinna W., Cappai M.G., Garau G., Sfuncia A., Nieddu G., Bitti M.P.L. (2007). Electronic identification (EID) vs Ear Tattoo (ET) during controls on milk production of sarda sheep. *Book of abstracts 5th International Symposium on the challenge to sheep and goat milk sectors FIL - IDF, Alghero (Italy) 18-20 Apr.*
- Pinna W., Cappai M.G., Garau G., Sfuncia A., Picciau M., Bitti M.P.L. (2007). First results about a Help Desk service on electronic identification in sheep. *Proceedings of the 58th EAAP Congress.*

# Effetto della riduzione del numero di mungiture giornaliere sulla produzione latte in ovini di razza Sarda



M. PIRAS, M.G. USAI, S. SALARIS, A. CARTA, SARA CASU

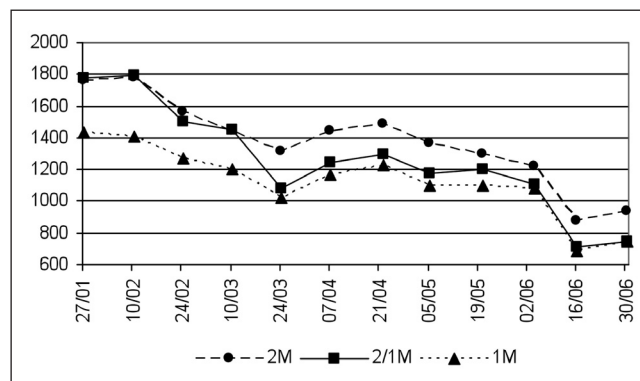
AGRIS Sardegna - Agenzia per la Ricerca in Agricoltura - 07040 Olmedo (SS) - Italia

**Parole chiave:** mungitura, produzione di latte.

**INTRODUZIONE** - L'attuale fase di crisi dell'allevamento ovino induce gli allevatori a verificare nuovi modelli di gestione del gregge, mirati ad abbattere i costi di produzione del latte e a incrementare i ricavi aziendali attraverso l'utilizzo della manodopera disponibile per attività legate al nuovo ruolo multifunzionale che si va prefigurando per le aziende ovine. In tale contesto la mungitura, svolta per due volte nella giornata, rappresenta una delle fasi più onerose del ciclo produttivo in termini di costi di gestione e impiego di manodopera. Diversi studi hanno precedentemente valutato gli effetti della riduzione del numero di mungiture in diverse razze stimando perdite comprese tra il 5 e il 35% (Casu e Labussière, 1972; Casu e Boyazoglu, 1974; McKusic et al., 2002). L'obiettivo del presente lavoro è quello di quantificare tali perdite nella razza Sarda in considerazione del miglioramento genetico per la produzione di latte realizzato negli ultimi decenni e della recente tendenza a una progressiva semplificazione della routine di mungitura.

**MATERIALI E METODI** - La prova è stata realizzata nell'annata produttiva 2009 presso l'azienda di Bonassai di Agris - Sardegna. Dopo lo svezzamento, avvenuto tra la metà di Dicembre e l'inizio di Febbraio, sono stati costituiti 3 gruppi di 48 pecore ciascuno, omogenei per età, data di parto, indice genetico per la produzione di latte e morfologia della mammella. A partire dallo svezzamento, avvenuto a circa 30 giorni dal parto, il primo gruppo (2M) è stato munto due volte al giorno per tutto il corso della prova sperimentale; il secondo (1M) è stato munto una sola volta al giorno alla mattina; il terzo (2/1M) è stato munto due volte al giorno sino a circa tre mesi dal parto (17/03), quando i livelli produttivi hanno uguagliato quelli di 1M all'inizio della mungitura (1,5 L/capo\*d), e successivamente solo il mattino sino alla fine della prova sperimentale. Gli animali di tutti e 3 i gruppi sono stati munti a macchina senza ripasso. I controlli funzionali per la stima delle produzioni sono stati effettuati a cadenza quindicinale dal 27/01 al 30/06. Al parto e una volta al mese è stato misurato lo stato di ingrassamento degli animali tramite valutazione della nota di stato corporeo. È da segnalare che per diversi motivi sanitari sono stati eliminati dalla prova: 2 pecore 1M a maggio e giugno; 2 pecore 2/1M a marzo, prima del passaggio ad una mungitura; 2 pecore 2M a maggio. Gli animali pascolavano insieme per 8 h giornaliere su erbai di loglio italico, trifoglio alessandrino e prati di cicoria foraggera e sulla. Inizialmente, al fine di evitare limitazioni della produzione di latte legate a deficit alimentari, l'integrazione consisteva per tutti i gruppi in 400 g/capo\*d di concentrato commerciale, 200 g/capo\*d di granella di Triticale, 100 g/capo\*d di fieno di medica. In considerazione del sensibile incremento dello stato di ingrassamento, l'integrazione con concentrato è stata dimezzata a partire dal 17/03 per 1M e dal 7/05 per 2/1M. I parametri analizzati sono stati la produzione di latte e i tenori in grasso e proteina per giorno (QLd, TGd, TPd) e per lattazione (QL, TG, TP). Le differenze tra gruppi per QLd, TGd, TPd sono state valutate con un modello lineare misto includente i fattori fissi gruppo, data di controllo e la loro interazione e il fattore casuale individuo. Inoltre, al fine di rendere disponibile agli allevatori un parametro utile per una valutazione dell'impatto economico della soppressione di una mungitura, QL, TG e TP sono stati sottoposti ad un'analisi di varianza includente il solo fattore fisso gruppo.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - QLd è stata significativamente inferiore in 1M rispetto a 2M con differenze percentuali comprese tra il 14 e il 20% (Figura 1). QLd di 2/1M è risultata differente da 2M solo dal passaggio a una sola mungitura con livelli produttivi simili a 1M. QL di 2M è risultata significativamente superiore a quella di 1M del 18,8% (medie stimate 229,9 vs 186,6 L/capo,  $P=0,0002$ ) e del 7,6% a quella di



**Figura 1** - Medie stimate della produzione di latte giornaliera (QLd, ml) nei 3 gruppi.

2/1M (212,2 L/capo) anche se non significativamente ( $P=0,125$ ). La produzione di 2/1M è risultata significativamente superiore a 1M del 12% ( $P=0,028$ ). Fra i tenori, solo TPd di 2/1M ha mostrato valori significativamente più elevati di 2M dopo il passaggio a una mungitura (0,28% in media). Al contrario non sono state osservate differenze significative tra TP e TG nei tre gruppi (medie stimate variabili tra 5,38 e 5,48% e tra 5,57 e 5,63% per TP e TG rispettivamente).

La riduzione della produzione di latte per effetto della riduzione del numero di mungiture è risultata superiore al 12% registrato da Casu e Boyazoglu (1974) in pecore Sarde con livelli produttivi altrettanto elevati. Tali differenze sono probabilmente imputabili alla soppressione, nel nostro caso, del ripasso. È presumibile infatti che il non completo svuotamento della mammella ne limiti la capacità di contenimento rendendo più marcate le differenze tra la doppia e la singola mungitura. Ulteriori dati sono necessari per confermare questa ipotesi e per verificare se le perdite produttive possano ridursi in lattazioni successive per effetto di un progressivo adattamento dell'animale. Al momento sembra più conveniente il passaggio a una mungitura solo nella seconda metà della lattazione. In ogni caso, la valutazione dell'impatto economico della soppressione di una mungitura dovrà tenere conto delle specifiche condizioni aziendali in termini di costo della manodopera e del peso dei ricavi provenienti dal latte o altre attività sul reddito aziendale. Qualora la pratica della soppressione di una mungitura dovesse diffondersi si potrà valutare quali criteri di selezione adottare per migliorare la capacità di contenimento dell'apparato mammario con particolare attenzione agli aspetti legati alla morfologia mammaria.

## ■ Effect on milk yield of daily milking frequency in Sarda dairy sheep

**Key words:** milk yield, milking frequency.

## Bibliografia

- Casu S. e Labussière (1972). *Annales de Zootech.* 21:223-232.  
 Casu S. e Boyazoglu J.G. (1974). *Annales de Zootech.* n. HS 139-144.  
 McKusic J., Thomas D.L., Berger Y.M., Marnet P.G. (2002). *Dairy Sci.* 85:2197-2206.

# Risposta anticorpale in capre sperimentalmente infestate con *Sarcoptes scabiei*



L. RAMBOZZI, A.R. MOLINAR MIN, A. MENZANO, L. ROSSI

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino  
Via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO)

**Parole chiave:** *Sarcoptes scabiei*, capre, risposta anticorpale.

**INTRODUZIONE** - Tarigan e Huntley (2005) hanno dimostrato che nella capra la vaccinazione con proteine solubili di *S. scabiei* stimola una produzione elevata di IgG, ma non immunizza gli animali ad una successiva infestazione, mentre ripetuti contatti con l'acaro sembrano essere più efficaci a fini protettivi. Obiettivo del presente studio è approfondire il legame che intercorre tra la risposta anticorpale e la capacità dell'ospite di sviluppare una forma di resistenza acquisita.

**MATERIALI E METODI** - Sono state utilizzate 8 capre femmine adulte provenienti da un allevamento a ciclo chiuso indenne da rogna sarcopica. La sperimentazione è stata articolata in 4 fasi: 1) Infestazione: sono stati utilizzati acari isolati da camosci naturalmente infestati. Una volta verificata la vitalità degli acari, questi sono stati deposti con una lama di bisturi sulla cute precedentemente depilata, a livello del garrese. La lama, fissata con cerotto adesivo, è stata rimossa 24 ore dopo. 2) Trattamento: Doramectina (Dectomax®) (200 mcg/kg, sc) ripetuta a distanza di 15 gg; 3) Reinfestazione; 4) Trattamento. Periodicamente, per tutta la durata della sperimentazione, si è proceduto ad un esame dermatologico completo, con documentazione fotografica delle lesioni, raschiato cutaneo profondo e prelievo di sangue per la ricerca di anticorpi anti-*Sarcoptes* utilizzando un test ELISA precedentemente descritto (Rambozzi et al., 2001).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Sia nel corso della prima che della seconda infestazione in tutti gli animali si sono osservati sintomi di

rogna e sono stati rilevati anticorpi specifici. Ad eccezione degli animali 1, 4 e 5, la remissione completa dei sintomi è stata osservata solo dopo la seconda somministrazione di doramectina. Durante la reinfestazione tutti gli animali, ad eccezione del 4, hanno manifestato sintomi più precocemente rispetto alla prima infestazione. La remissione dei sintomi è avvenuta spontaneamente negli animali 4 e 5, mentre negli animali 1, 2, 3, 6 e 8 la remissione completa dei sintomi è stata osservata solo dopo la seconda somministrazione di doramectina. Nella prima infestazione la comparsa degli anticorpi ha anticipato la sintomatologia clinica. La positività sierologica è risultata contemporanea alla comparsa dei sintomi solo negli animali 4 e 7. Anche durante la reinfestazione la comparsa degli anticorpi è stata registrata in anticipo (2, 3, 4) o contemporaneamente alla comparsa dei sintomi (1, 5, 6, 7 e 8). In Tabella 1 è illustrata, per ogni animale, l'evoluzione clinica correlata alla risposta anticorpale.

Dai risultati ottenuti emerge che la risposta immunitaria a *S. scabiei* non è sovrapponibile all'evoluzione del quadro clinico. Nella prima infestazione la risposta anticorpale è risultata contemporanea, se non anticipata, alla comparsa dei sintomi. Anche i soggetti che presentavano una sintomatologia scarsa hanno sviluppato una risposta anticorpale, benché meno rapida ed intensa di quelli con sintomatologia clinica pronunciata. Inoltre, in un animale con sintomatologia particolarmente intensa, il titolo anticorpale si è negativizzato prima della scomparsa dei sintomi. La risposta anticorpale umorale, quindi, sembrerebbe non avere alcun valore protettivo nei confronti di una eventuale reinfestazione e gli anticorpi non sembrano riferibili ad una forma di resistenza acquisita. Come in altre specie animali (Bornstein e Zakrisson, 1993; Little et al., 1998), la risposta anticorpale umorale deriverebbe da un'alterazione dei meccanismi fisio-patogenetici con una conseguente risposta deviata e controproducente in animali in cui ha fallito la risposta immunitaria cellulare.

## Experimental infection of goats with *Sarcoptes scabiei*

**Key words:** *Sarcoptes scabiei*, goat, experimental infection.

**Tabella 1** - Prospetto riassuntivo dei risultati inerenti lo studio sierologico e la sintomatologia.

N°	1ª infestazione (settimane)											Trattamento (settimane)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1									•	•	•	•				
2			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
3			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
4		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			
5					•	•	•	•	•	•	•	•	•			
6					•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
7			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
8					•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
N°	Reinfestazione (settimane)											Trattamento (settimane)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
2		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
3		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
4			•	•	•	•										
5	•	•														
6	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
7	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
8		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	

(•): presenza di sintomi riferibili a rogna e raschiato cutaneo positivo; ■: test ELISA positivo per *Sarcoptes scabiei*.

## Bibliografia

- Bornstein S. e Zakrisson G. (1993). Veterinary Dermatology, 4, 123-131.  
Little S.E., Davidson W.R., Rakich P.M., Nixon T.L., Bounous D.I., Nettles V.F. (1998). Journal of Wildlife Diseases, 34(3), 600-11.  
Rambozzi L., Rossi L., Menzano A. (2001). COST 833 Agriculture - "Mange and Myiasis in Livestock" - 4th Annual Meeting - Toulouse, 3-6 Ottobre 2001: 70-73.  
Tarigan S. e Huntley J.F. (2005). Veterinary Parasitology, 133, 101-109.



# La GAS (Gene Assisted Selection) per il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte di capra



L. RAMUNNO<sup>1</sup>, A. PAUCIULLO<sup>1</sup>, A. RANDO<sup>2</sup>, P. CREPALDI<sup>3</sup>, F. PILLA<sup>4</sup>,  
D. GALLO<sup>1</sup>, L. COLIMORO<sup>1</sup>, A. D'AVINO<sup>1</sup>, S. MURRU<sup>5</sup>, P. FRESI<sup>5</sup>, B. CAPOGRECO<sup>6</sup>,  
F. DE NARDO<sup>7</sup>, P. MASINA<sup>2</sup>, G. COSENZA<sup>1</sup>, D. DI BERARDINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici (Na)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli Studi della Basilicata, Potenza

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>4</sup> Dipartimento Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso

<sup>5</sup> ASSONAPA - Associazione Nazionale della Pastorizia, Roma

<sup>6</sup> APA - Associazione Provinciale Allevatori di Reggio Calabria, Reggio Calabria

<sup>7</sup> Associazione Interprovinciale Allevatori Catanzaro, Crotone

**Parole chiave:** *Capra hircus*, GAS, genotipizzazione, caseine.

**INTRODUZIONE** - La capra è tra le specie di interesse zootecnico, un esempio unico di variabilità nell'espressione dei geni *CSN1S1*, *CSN2* e *CSN1S2* che codificano per le caseine  $\alpha s1$ ,  $\beta$  e  $\alpha s2$ . Il polimorfismo della caseina  $\alpha s1$  è dovuto alla presenza di almeno 16 alleli che sulla base del contenuto di tale frazione nel latte possono essere classificati in 4 gruppi: alleli forti (~3,5 g/L), medi (~1,1 g/L), deboli (~0,45 g/L), e nulli (per una review Cosenza *et al.*, 2008). Analogamente, le differenze individuali d'espressione al locus *CSN2* sono determinate dalla presenza di almeno 8 alleli associati a 2 livelli quantitativi: normale (~5 g/L) e nullo (per una review Cosenza *et al.*, 2007), mentre al locus *CSN1S2* sono noti 7 alleli responsabili di 3 livelli di espressione: normale (~2,5 g/L), ridotto (~1,5 g/L) e nullo (per una review Ramunno *et al.*, 2001). È stato dimostrato che tali differenze non hanno effetto solo sul contenuto di proteine nel latte, ma anche sul diametro e sul contenuto in calcio delle micelle proteiche, con conseguenze sulla resa casearia e sulle caratteristiche tecnologiche del latte (Remuef, 1993; Ramunno *et al.*, 1995). L'individuazione degli eventi molecolari responsabili di tali differenze ha reso possibile l'utilizzazione di tali geni (Selezione Assistita da Geni, GAS) per il miglioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte di capra. Obiettivo del presente lavoro, realizzato nell'ambito di un progetto Mipaf di rilevanza nazionale (SelMol), è stato quello di determinare il genotipo ai loci delle caseine Ca-sensibili di becchi appartenenti ad alcune razze allevate in Italia destinati ad FA.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta su un 244 campioni individuali di DNA estratto da pelo e sangue di becchi di razza Camosciata (57), Saanen (45), Nicastrrese (102) e Aspromontana (40). Gli alleli *CSN1S1* E, F, N, O1 sono stati evidenziati per mezzo di PCR, PCR-RFLP e AS-PCR (per una review Cosenza *et al.*, 2008), l'allele *CSN2* O1 per mezzo di AS-PCR (Cosenza *et al.*, 2007) e gli alleli *CSN1S2* D e 0 per mezzo di PCR-RFLP (Ramunno *et al.*, 2001).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I risultati dell'indagine hanno evidenziato per le razze Camosciata, Nicastrrese e Aspromontana un'alta frequenza di alleli associati ad un alto contenuto di caseina  $\alpha s1$  (*CSN1S1* A\*). La razza Saanen, invece, si caratterizza per un'alta frequenza di alleli associati ad intermedio e basso contenuto di caseina  $\alpha s1$  (*CSN1S1* F + E, 0,760). Gli alleli nulli ai tre loci risultano assenti o con una bassa frequenza in tutte e 4 le razze indagate (Tabella 1). Il confronto dei risultati ottenuti con quelli relativi ad una indagine condotta da Ramunno *et al.* (1994) su 3 delle razze investigate (Camosciata, Saanen e Nicastrrese) consente di valutare come, nel tempo, si sia modificata la frequenza allelica a tali loci. In particolare, per la razza Camosciata si osserva una netta inversione rispetto alla situazione attuale nella frequenza di alleli associati ad alto contenuto di caseina  $\alpha s1$  (0,006 vs 0,620). Tale tendenza risulta meno accentuata per la razza Saanen per la quale si osserva un relativo aumento della frequenza degli alleli associati ad alto contenuto di caseina  $\alpha s1$ , passando da un valore di 0,063 a 0,200. Per la razza Nicastrrese, identificata da Ramunno *et al.* (1994) come popolazione locale, le frequenze al locus *CSN1S1* degli alleli "forti" non appaiono particolarmente variare nel tempo (0,777 vs 0,630). Di contro, si osserva una netta diminuzione della frequenza dell'allele nul-

**Tabella 1** - Frequenze alleliche ai loci *CSN1S1*, *CSN2* e *CSN1S2* di becchi di razza Camosciata (C), Saanen (S), Nicastrrese (N) e Aspromontana (A).

*CSN1S1* A\* = A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, M; *CSN1S1* O\* = O1, N; *CSN2* A\* = A, A1, B, C, D, E; *CSN1S2* A\* = A, B, C, E, F.

Razza	N.	CSN1S1				CSN2		CSN1S2	
		A*	E	F	O*	A*	O1	A*	O1
C	57	0,62	0,17	0,14	0,07	1,00	0,00	1,00	0,00
S	45	0,20	0,26	0,50	0,04	0,96	0,02	1,00	0,00
N	102	0,63	0,02	0,34	0,01	0,98	0,02	0,97	0,03
A	40	0,67	0,00	0,31	0,02	0,89	0,11	0,92	0,08
TOT	244								

lo della caseina  $\beta$  (0,103 vs 0,020) riconducibile, verosimilmente, all'azione di una selezione naturale contro le femmine omozigoti per tale allele in quanto producono un latte ipoproteico (Ramunno *et al.*, 1995) che compromette lo sviluppo dei piccoli. La variazione nelle frequenze alleliche al locus *CSN1S1* nella razza Camosciata è, invece, la diretta conseguenza dell'applicazione della Selezione Assistita da Geni (GAS) resa possibile grazie all'individuazione di marcatori a tale locus. Ciò rappresenta un chiaro esempio di come con l'ausilio della GAS sia possibile selezionare in modo rapido, accurato ed economico gruppi di animali che producono tipi diversi di latte con caratteristiche peculiari in grado di poter soddisfare le diverse richieste del mercato.

■ **The GAS (Gene Assisted Selection) for the quali-quantitative improvement of goat milk characteristics**

**Key words:** *Capra hircus*, GAS, genotyping, casein.

## Bibliografia

- Cosenza G., Pauciuolo A., Colimoro L., Mancusi A., A. Rando A., Di Berardino D., Ramunno L. (2007) - A SNP in the goat *CSN2* promoter region is associated with the absence of  $\beta$ -casein in the milk. *Animal Genetics* 38: 655-658.
- Cosenza G., Pauciuolo A., Gallo D., Colimoro L., D'avino A., Mancusi A., Ramunno L. (2008) - Genotyping at the *CSN1S1* locus by PCR-RFLP and AS-PCR in a neapolitan goat population. *Small Ruminant Research*, 74: 84-90.
- Ramunno L., Rando A., Di Gregorio P., Capogreco B., Masina P. (1994) - Indagine di popolazione sui geni a effetto maggiore sul contenuto di caseina  $\alpha s1$  e  $\beta$  nel latte di capra. *Zoot. Nutr. Anim.*, 20: 107-111.
- Ramunno L., Mariani P., Pappalardo M., Rando A., Capuano M., Di Gregorio P., Cosenza G. (1995) - Un gene ad effetto maggiore sul contenuto di caseina  $\beta$  nel latte di capra. *Atti XI Cong. Naz. A.S.P.A., Grado (Go)*: 185-186.
- Ramunno L., Cosenza G., Pappalardo M., Longobardi E., Gallo D., Pastore N., Di Gregorio P., Rando A. (2001) - Characterization of two new alleles at the goat *CSN1S2* locus. *Animal Genetics* 32: 264-268.

# Duplicazione al locus dell'alfa lattoalbumina nei ruminanti: evidenze negli ovini



R. RULLO<sup>1</sup>, A. DI LUCCIA<sup>2</sup>, I. ALLOGGIO<sup>3</sup>, E. PIERAGOSTINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CNR - ISPAAM - Via Argine, 1085 - 80147 Ponticelli, Napoli

<sup>2</sup> Dipt. Scienze degli Alimenti - Via Napoli, 25 - Foggia

<sup>3</sup> Dipt. PROGESA - Università di Bari - Via Amendola, 165/A - Bari

**Parole chiave:**  $\alpha$ -LA, duplicazione genica, pecora, siero proteine.

**INTRODUZIONE** - La percentuale dei geni duplicati nel genoma degli eucarioti varia tra l'8% ed il 20% e la frequenza con la quale si verificano gli eventi di mutazione è stimata tra 0,2% e 2% per gene per milione di anni (Moore & Purugganan, 2003).

Recenti studi (Rullo et al., 2010) hanno dimostrato che nel bufalo il gene che determina la  $\alpha$ -lattoalbumina (LALBA) è duplicato. Ricordando che  $\alpha$ -lattoalbumina ( $\alpha$ -LA) è generalmente presente nei ruminanti in due forme proteiche denominate A e B (Schmidt & Ebner, 1972), è interessante notare, che Rullo et al. (2010) erano stati indotti ad indagare sul LALBA a seguito dell'osservazione relativa al polimorfismo quantitativo riscontrato in un soggetto eterozigote AB, ma che prove della duplicazione sono state ottenute anche analizzando il DNA genomico degli animali omozigoti AA.

Lo stesso tipo di polimorfismo è stato osservato nel bovino (Pieragostini et al., 2000) ed anche in questo caso la presenza di prodotti del LALBA diversamente espressi ha suggerito che il meccanismo sotteso a questo fenomeno fosse la presenza di geni non allelici. Con metodo analogo a quello utilizzato nel caso del bufalo anche nel bovino è stata confermata la presenza di arrangiamenti genici duplicati in tutti i soggetti esaminati (Rullo et al., dati non ancora pubblicati). La conferma di duplicazione del sistema LALBA riscontrata nell'ambito della famiglia Bovinae a seguito del rinvenimento di un frammento intergenico di 6200 bp in tutti i soggetti casuali indagati fa supporre che il fenomeno sia ampiamente diffuso e che l'evento di duplicazione sia avvenuto in tempi remoti.

Sulla base di considerazioni filogenetiche sulla famiglia Bovidae e biologiche sul ruolo fondamentale della  $\alpha$ -LA nella ghiandola mammaria per la produzione del latte e la conseguente sopravvivenza della prole, gli Autori ritengono altamente probabile che la duplicazione si ritrovi anche all'interno della sottofamiglia Caprinae. Questo lavoro riporta i primi risultati ottenuti da un esperimento allestito per studiare l'assetto genico del sistema LALBA nell'ovino.

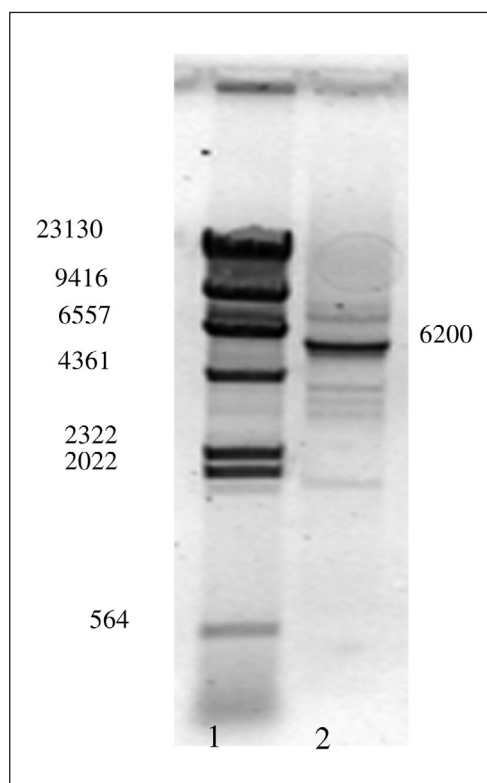
**MATERIALI E METODI** - I 10 campioni utilizzati per questa indagine sono stati ottenuti a seguito di una ricognizione fatta per altri scopi sulla razza Altamurana allevata presso l'azienda silvo-pastorale Cavone. Il DNA genomico è stato isolato dai leucociti con Wizard genomic DNA purification kit (Promega). La reazione di PCR è stata ottimizzata con Gene Amp XL PCR kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) e sono stati utilizzati circa 250  $\mu$ g di DNA precedentemente preparati. Il segmento intergenico dei geni LALBA è stato amplificato dopo la PCR e quindi la nested, la prima amplificazione è avvenuta dal terzo esone del gene a monte al secondo di quello a valle, quindi dal quarto esone a monte al primo a valle (vedi figura gel). Gli oligo della PCR e quindi della nested sono stati disegnati dalla sequenza del gene LALBA di pecora presente in Banca Dati a. n°. X12817.

Per la PCR e nested PCR sono stati utilizzati rispettivamente i seguenti oligo:

1) ARV 5' CTCACGTGTCACAGGAGATGT 3';  
BFW 5' CCTGGATGATGATCTTACTG 3'

2) CRV 5' GAGATGGAGGGAAAGAGTG 3';  
DFW 5' TTTGCCTTGTCTCCTTCTTC 3'

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La Figura 1 esemplifica i risultati dell'amplificazione ottenuta dalla nested PCR del DNA genomico ovino. Nel tracciato 2 compare come singola banda un frammento di DNA di circa 6.200 bp. Va sottolineato che la Figura 1 mostra il tracciato ottenuto da un singolo campione, ma che in tutti i campioni esaminati era presente detto frammento, la cui dimensione ricalca quella del frammento osservato nel caso del bufalo e che, una volta sequenziato, ha



**Figura 1** - Gel agarosio 0,8%. Lane 1, Lambda DNA - Hind III size marker. Lane 2, mostra la banda di DNA di circa 6200 coppie di basi che conferma la presenza del tratto intergenico fra i geni duplicati di LALBA.

confermato rappresentare la regione intergenica intercorrente fra le due copie del LALBA. Questo risultato, sebbene necessiti di approfondimenti di indagine, dà comunque forza all'ipotesi che il fenomeno della duplicazione del LALBA sia presente anche nell'ovino.

## ■ Evidence of gene duplication at the alpha-lactalbumin locus in sheep (*Ovis aries*, L.)

**Key words:**  $\alpha$ -LA, gene duplication, sheep, whey protein.

## Bibliografia

- Moore R.C., and Purugganan M.D. 2003. The early stages of duplicate gene evolution. PNAS, 100, 15682-15687.
- Pieragostini E., Scaloni A., Rullo R., Di Luccia A., 2000. Identical marker alleles in Podolic cattle (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) Comp. Biochem. Physiol. 127, 1-9.
- Rullo R., Di Luccia A., Chianese L., Pieragostini E. Hot topic: Gene duplication at the alpha-lactalbumin locus: finding the evidence in water buffalo (*Bubalus bubalus* L.). J Dairy Sci. 2010 May; 93(5):2161-7.
- Schmidt, D.V. & Ebner, K.E. 1972. Multiple forms of pig, sheep and goat  $\alpha$ -lactalbumin. Biochim. Biophys. Acta, 263, 714-720.

# Bilancio di 10 anni di selezione per la resistenza genetica alla Scrapie nella popolazione iscritta al Libro Genealogico della razza ovina Sarda



S. SALARIS<sup>1</sup>, A. PERNISA<sup>1</sup>, L. CRASTA<sup>1</sup>, A. FRAGHÌ<sup>1</sup>, P. FRESI<sup>2</sup>, SARA CASU<sup>1</sup>, A. CARTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AGRIS Sardegna, DIRPA, Settore Genetica e Biotecnologie, 07040 Olmedo, Italia

<sup>2</sup> ASSONAPA, 00155 Roma, Italia

**Parole chiave:** encefalopatie spongiformi trasmissibili, selezione genetica.

**INTRODUZIONE** - La selezione genetica per la resistenza alla Scrapie è stata avviata in Sardegna nel 2000. L'attività di selezione è stata rivolta inizialmente agli arieti del centro di FA della razza Sarda. Successivamente in seguito alle direttive dell'Unione Europea (Decisione 2003/100/CE) e delle Linee Guida Nazionali, è stato avviato nel 2004 il Piano Regionale della Sardegna (PR). Il PR inizialmente ha reso obbligatoria l'adesione solo agli allevatori iscritti al Libro Genealogico (LG). Nel 2009 l'adesione è stata resa obbligatoria a tutti gli allevamenti (Decreto Assessorato dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale n. 615/DecA/4 29/04/2009). L'obiettivo principale del PR è l'incremento della frequenza dell'allele resistente (ARR). L'attuale PR prevede l'impossibilità di movimentare arieti omozigoti sensibili (tipo ARQ/ARQ) in tutto il territorio regionale e stabilisce al 31 dicembre 2011 la data ultima per il loro utilizzo negli allevamenti. Il PR prevede anche l'adozione di una strategia selettiva che limiti l'impatto sul progresso genetico per i caratteri produttivi. A tal fine vengono fornite indicazioni affinché gli allevatori privilegino a parità di genotipo PrP arieti del LG. Inoltre, le norme che regolano il funzionamento degli arieti nel LG sono state modificate consentendo a giovani maschi non ancora provati per la produzione di latte ma con indice pedigree elevato e genotipo omozigote resistente di essere impiegati come padri d'ariete. Inoltre, al fine di recuperare importanti linee di sangue particolarmente valide per la produzione di latte ma di genotipo sensibile sono stati realizzati accoppiamenti tra arieti di elevato valore genetico per la produzione di latte con pecore omozigoti resistenti al fine di produrre una progenie resistente.

L'obiettivo di questo lavoro è presentare il bilancio genetico delle attività di selezione al fine di verificare la potenziale disponibilità di genotipi resistenti di buon livello genetico per i caratteri produttivi per l'intera popolazione di razza Sarda.

**MATERIALI E METODI** - Nell'ambito del programma di selezione genetica per la resistenza alla Scrapie nel LG della razza Sarda gestito da ASSONAPA, sono stati analizzati i dati relativi alle analisi del genotipo al locus PrP realizzate a partire dal 2000 sugli arieti e sulle pecore di elevato indice pedigree destinate a generare maschi idonei al funzionamento nel LG. L'evoluzione della quota di animali resistenti disponibili per la riproduzione è stata valutata calcolando le frequenze alleliche e genotipiche (RR: omozigote resistente; RS: eterozigote resistente; SS: sensibile) per anno di nascita.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Sono stati raccolti a partire dal 2000 per gli arieti e dal 2002 per le pecore 290.050 campioni di bulbi piliferi, di cui 259.296 di pecore. La determinazione al locus PrP è stata effettuata su 53.784 animali di cui il 49% erano arieti (Tabella 1). La frequenza dell'allele ARR stimata all'interno della popolazione iscritta al LG al momento dell'avvio del PR era del 42% (Salaris et al., 2004). Nella Tabella 2 si riporta l'andamento della frequenza dell'allele ARR per anno di nascita degli animali analizzati. Rispetto all'inizio del PR, la frequenza dell'allele resistente è aumentata di oltre 20 punti percentuali (in media 4% annuo). Tale incremento è avvenuto senza decrementi significativi del progresso genetico sui caratteri produttivi (Salaris et al., 2007). Rimane da accertare l'eventuale impatto del PR sulla variabilità genetica. Le frequenze genotipiche stimate degli animali utilizzati per la riproduzione nel 2007 sono risultate: 36,6% RR, 50% RS e 13,3% SS negli arieti; 22,8% RR, 48,3% RS e 28,9% SS nelle pecore.

Nell'ipotesi che il numero di maschi nati nel LG corrispondano al numero di agnelle di rimonta (circa 50.000 nel 2008) e sulla base delle frequenze genotipiche stimate, il numero di agnelli RR selezionati anche per la produzione di latte che possono essere potenzialmente prodotti negli allevamenti iscritti al LG per soddisfare le esigenze degli allevamenti commerciali è di

**Tabella 1** - Determinazioni al locus PrP in Sardegna nella popolazione iscritta al Libro Genealogico della razza Sarda dal 2000 al 2010 (maggio 2010).

Anno	Pecore	Arieti	Totale
2000	0	159	159
2001	0	47	47
2002	0	83	83
2003	2.419	442	2.861
2004	3.016	270	3.286
2005	5.428	7.945	13.373
2006	4.125	3.093	7.218
2007	5.518	3.447	8.965
2008	2.315	3.568	5.883
2009	2.657	3.897	6.554
2010	1.731	3.624	5.355
<b>Totale</b>	<b>27.209</b>	<b>26.575</b>	<b>53.784</b>

**Tabella 2** - Frequenza dell'allele ARR (%) per anno di nascita nella popolazione iscritta al LG della razza Sarda.

Anno di nascita	Pecore		Arieti		Totale	
	N.	%	N.	%	N.	%
2004*	14.119	43,2	6.835	45,8	20.954	44,1
2005	4.478	47,7	3.499	45,9	7.977	46,9
2006	3.441	47,0	2.876	51,3	6.317	49,0
2007	1.777	53,5	3.331	55,7	5.108	54,9
2008	2.809	55,4	3.544	57,8	6.353	56,7
2009	585	70,3	3.529	61,0	4.114	62,3
2010	0		2.961	66,7	2.961	66,7

\*Si riferisce a tutti gli animali nati entro il 2004.

circa 14.000. Tale disponibilità sembra essere sufficiente a soddisfare le richieste degli allevamenti commerciali senza eccessive distorsioni dei prezzi di mercato anche in considerazione delle recenti norme regionali e nazionali (MIPAAF DM 29.07.2009; LR n.1 art. 4, 14.05.2009) che prevedono incentivi per l'acquisto di tale tipologia di arieti.

*Lavoro svolto all'interno del programma "Scrapie" finanziato dal MiPAAF (Decreto n. 45602 del 1.2.2010).*

## ■ Outcome of 10 years of selection for Scrapie resistance in the Flock-book of the Sarda sheep breed

**Key words:** transmissible spongiform encephalopathy, genetic selection.

## Bibliografia

- Salaris S., Casu S., Carta A. (2007). J. Anim. Sci. 2007. 85:2840-2845.  
 Salaris S., Crasta L., Fozzi P., Fraghì A., Casu S., Sanna S.R., Carta A. (2004).  
 Proc. of XVI National Congress S.I.P.A.O.C., 29/09 - 02/10, Siena, Italy.



# Valorizzazione di formaggi tradizionali della regione Marche



S. SANTARELLI, V. BABINI, L. AQUILANTI, C. GAROFALO, A. OSIMANI, F. CLEMENTI

Dipartimento di Scienze Alimentari, Agro-Ingegneristiche, Fisiche, Economico-Agrarie e del Territorio  
Università Politecnica delle Marche - Via Brecce Bianche - 60131 Ancona

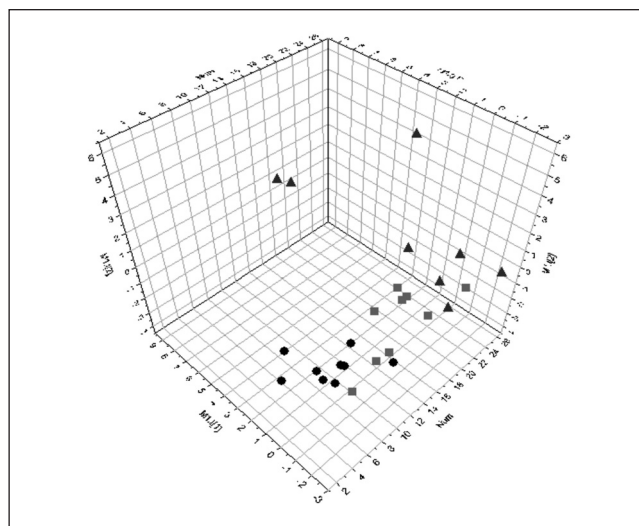
**Parole chiave:** formaggi tradizionali, regione Marche, marcatori di qualità.

**INTRODUZIONE** - La tradizione casearia dell'Italia centrale comprende una grande varietà di formaggi prodotti con latte locale e antiche tecniche di caseificazione. Tali formaggi sono parte integrante del patrimonio storico e culturale delle comunità locali, nonché risorse da conservare e valorizzare, anche a fronte del sempre più incalzante processo di globalizzazione. La regione Marche, in particolare, vanta un cospicuo numero di produzioni casearie tipiche, come riportato nell'“Elenco nazionale dei prodotti agro-alimentari tradizionali” (DM 18/07/2000). La valorizzazione di tali produzioni rappresenta un obiettivo primario delle politiche volte a promuovere la salvaguardia delle risorse e dello sviluppo socio-economico dei territori locali.

Obiettivo della presente ricerca è stato la caratterizzazione composizionale, microbiologica ed aromatica di produzioni tradizionali di Caciotta, Pecorino e Caprino della regione Marche, anche caratterizzate da tratti peculiari quali l'impiego di caglio ovino o vegetale (estratto acquoso di *Cynara cardunculus*), l'aggiunta di ingredienti caratteristici (erbe locali, olio d'oliva, buccia di limone grattugiata) o la stagionatura in fosse tufacee. I dati ottenuti dalle analisi fisico-chimiche, microbiologiche e gas-cromatografiche sono stati elaborati statisticamente al fine di individuare correlazioni con le specifiche tecniche di caseificazione ed identificare marcatori oggettivi di qualità.

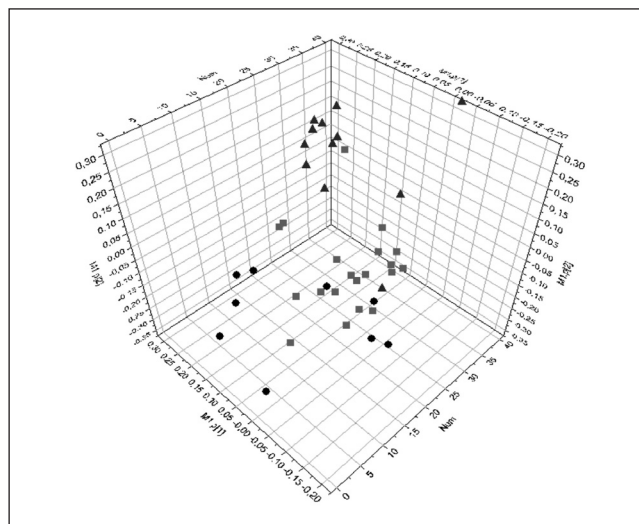
**MATERIALI E METODI** - Sono stati campionati complessivamente 26 formaggi, di cui 8 Caprini, 9 Pecorini e 9 Caciotte da latte misto; di questi, le produzioni a latte crudo (16 campioni) sono state prelevate presso caseifici artigianali della regione Marche, mentre i formaggi a latte pastorizzato (10 campioni) sono stati acquistati presso supermercati della provincia di Ancona. Tutti i campioni sono stati sottoposti a: (i) determinazione del contenuto di NaCl, proteina grezza e grassi totali; (ii) misurazione di pH, attività dell'acqua ( $a_w$ ), numero di perossidi della sostanza grassa; (iii) ricerca di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. ed enterotossine stafilococciche; (iv) enumerazione di batteri lattici mesofili e termofili; (v) analisi PCR-DGGE della popolazione batterica (Babini *et al.*, 2008a); (vi) analisi della componente volatile mediante SPME-GC (Babini *et al.*, 2008b). L'insieme dei dati composizionali, microbiologici, e del profilo aromatico è stato sottoposto ad analisi PCA (Principal Component Analysis) e PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) utilizzando il software SIMCA-Pv 11.5 (UMETRICS).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Tutte le produzioni in studio sono risultate conformi ai limiti legislativi per i parametri igienico-sanitari considerati. L'analisi multivariata mediante PCA dei dati composizionali, microbiologici e gas-cromatografici ha prodotto un modello a 2 componenti che spiega il 33% della varianza. Nello *score plot* t1/t2, le 3 tipologie di formaggio sono risultate ben separate; al contrario, non è stato possibile separare i formaggi sulla base del processo produttivo (da latte crudo o pastorizzato), indipendentemente dalla tipologia considerata (Caciotta, Pecorino o Caprino) (Figura 1). Il corrispondente *loading plot* ha permesso di evidenziare 3 gruppi di variabili; nello specifico, le variabili relative al profilo aromatico sono risultate responsabili della distinzione dei formaggi appartenenti alla tipologia Caprino; quelle relative a conte microbiche, proprietà fisico-chimiche e composizionali hanno permesso di separare i formaggi appartenenti alla tipologia Caciotta; infine, le variabili relative all'ecologia microbica sono risultate utili per discriminare i formaggi appartenenti alla tipologia Pecorino (Figura 2). In particolare, conte più elevate di batteri lattici e valori più alti di  $a_w$  hanno permesso di differenziare le Caciotte dai Pecorini e Caprini, questi ultimi caratterizzati da concentrazioni più elevate di composti aromatici, mentre i Pecorini si sono distinti per la presenza delle specie *Lactobacillus coryniformis*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. plantarum*. L'analisi PLS-DA ha prodotto un modello a 2 componenti; più in dettaglio, lo *score plot* t1/t2 ha confermato la separazione delle 3 tipologie di formaggio. Dall'analisi del corrispondente *loading plot*, è emerso che tale separazione è principalmente dovuta a 6 descrittori legati alla definizione del profilo aromatico: contenuto in acido butirrico, caproico, enantico, caprilico, caprico ed undecenoico (dati non mostrati). L'approccio polifasico utilizzato ha permesso, nel complesso, di caratterizzare le produzioni casearie considerate, nonché di identificare marcatori utili per una discriminazione oggettiva delle stesse.



**Figura 1** - PCA-3D score plot.

● Caciotte    ■ Pecorini    ▲ Caprini



**Figura 2** - PCA-3D loading plot.

● Variabili relative a conte microbiche, proprietà fisico-chimiche composizionali  
■ Variabili relative alla composizione della microflora fermentante  
▲ Variabili relative al profilo aromatico

## ■ Exploitation of traditional cheeses from the Marche region

**Key words:** traditional cheeses, Marche region, quality markers.

## Bibliografia

- Babini V., Santarelli S., Aquilanti L., Bocci P., Osimani A., Tucci E., Garofalo C. e Clementi F. (2008a), *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 59: 303-310.  
Babini V., Maggi V., Aquilanti L., Osimani A., Taccari M., Ciani M. e Clementi F. (2008b), *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 59: 425-429.



# Studio degli effetti della selezione per la resistenza alla scrapie sulla variabilità genetica nella razza ovina Sambucana



S. SARTORE<sup>1</sup>, R. RASERO<sup>1</sup>, S. COLUSSI<sup>2</sup>, P.L. ACUTIS<sup>2</sup>, S. PELETTI<sup>2</sup>, D. SOGLIA<sup>1</sup>, S. MAIONE<sup>1</sup>, V. SPALENZA<sup>1</sup>, P. SACCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSTO)

**Parole chiave:** pecora, scrapie, selezione, variabilità.

**INTRODUZIONE** - Il gene della proteina prionica ovina, PRNP, presenta alcuni alleli associati a differenze di resistenza alla scrapie, encefalopatia spongiforme trasmissibile caratteristica degli ovicapri: l'allele ARR è responsabile di resistenza alla forma tipica, ARQ di suscettibilità, VRQ della massima suscettibilità. L'Unione Europea ha introdotto la possibilità da parte degli Stati Membri di applicare piani di selezione ai fini di incrementare la resistenza genetica alla scrapie delle rispettive popolazioni ovine. L'Italia ha recepito le direttive comunitarie rendendo obbligatoria la selezione per le greggi di elevato merito genetico a partire dall'aprile 2005 al fine di aumentare la frequenza di ARR, ridurre ARQ ed eliminare VRQ. Le razze caratterizzate da modesta consistenza, in seguito all'applicazione del programma selettivo, potrebbero subire perdita di variabilità genetica ed incremento di consanguineità. La razza ovina Sambucana conta circa 3500 animali ed è minacciata di abbandono. L'obiettivo della presente indagine è la valutazione dell'impatto della selezione a medio-lungo termine sulla variabilità genetica della Sambucana.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati scelti due gruppi di giovani maschi, precedentemente tipizzati per il gene PRNP dall'IZSTO: 80 nati nel 2004, prima dell'avvio del programma selettivo, 67 nati dopo il 2005 (2008-2009).

La variabilità genetica è stata stimata mediante 15 loci microsatelliti distribuiti su cromosomi diversi da OAR13, su cui mappa PRNP; in tal modo si è inteso considerare il complesso del genoma esente da effetti diretti della selezione per la resistenza alla scrapie. I prodotti di PCR sono stati separati con analizzatore genetico. Il tasso di errore è stato determinato replicando *random* il 10% dei campioni.

Le statistiche sono state calcolate con i software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995), Arlequin 3.11 (Schneider e coll. 2000) e Graph-Pad InStat 3.06 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA, 2003).

Informazioni sulla struttura demografica della razza sono state raccolte sia direttamente in 13 aziende (1362 animali) sia sul sito dell'Assonapa (<http://www.assonapa.com/>) e hanno permesso di stimare l'intervallo tra generazioni e la grandezza effettiva della popolazione,  $N_e$  (Falconer 1989). L'eterozigosi residua dopo 50 anni di applicazione del piano selettivo è stata stimata come  $H_t = H_0(1 - 1/2N_e)^t$ , dove  $t$  è il numero di generazioni che si succedono in 50 anni,  $H_0 = H$  ante 2005 e  $H_t$  l'eterozigosi prevista alla  $t$ -esima generazione.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Un locus è stato eliminato dall'analisi perché non ha fornito prodotti di PCR nel 46% dei campioni. Sui 14 loci restanti il tasso di errore è risultato inferiore all'1%. I due gruppi non si sono differenziati in modo significativo (*t test*) per eterozigosi, numero di alleli e ricchezza allelica (Tabella 1). L'indice  $F_{st}$  è risultato egua-

**Tabella 2** - Frequenze alleliche del locus PRNP.

	ante 2005	post 2005
ARR	0,319	0,567
ARQ	0,543	0,366
AHQ	0,025	0,037
ARH	0,019	0,000
VRQ	0,094	0,030

le a 0,005 e non significativo: solo lo 0,5% della variabilità dipende dal fatto che sono stati confrontati due gruppi diversi di animali. Pertanto le differenze di frequenze alleliche sono da considerarsi casuali.

I due gruppi si differenziano invece in modo significativo per le frequenze alleliche al locus PRNP. Ciò indica che la selezione per la resistenza alla scrapie sta ottenendo risposta ( $F_{st}=0,073$ ,  $P<0,001$ ) (Tabella 2).

Le informazioni demografiche hanno permesso di stimare un intervallo tra generazioni di circa 5 anni ed una  $N_e=645$  (2005). La perdita di eterozigosi che la popolazione potrebbe subire nei prossimi 50 anni in funzione di tale valore di  $N_e$ , costante nel tempo, è risultata di circa l'1%, una previsione che deve essere interpretata con molta cautela: poiché non è stato possibile tenere conto della varianza della numerosità della progenie, l'approccio usato per calcolare  $N_e$  potrebbe aver sovrastimato la grandezza effettiva della popolazione e sottostimato la successiva perdita di eterozigosi.

I risultati della presente indagine, sebbene limitati ad una sola generazione per quanto concerne l'approccio molecolare, evidenziano che la popolazione ha conservato la propria variabilità genetica nonostante la pressione selettiva alla quale è sottoposta. Una frequenza dell'allele ARR quale quella riscontrata nella Sambucana prima dell'inizio del programma di selezione è quindi da considerarsi sufficiente per ottenere una risposta significativa senza eccessivi rischi per la conservazione della variabilità della popolazione. Ai fini della conservazione sarà comunque fondamentale evitare riduzioni di grandezza, reale ed effettiva.

Ricerca eseguita con finanziamento Prin 2007XT947K.

## ■ Effects of PRNP selection program on genetic diversity of the Sambucana sheep breed

**Key words:** sheep, scrapie, selection, diversity.

**Tabella 1** -  $H$ : eterozigosi attesa media,  $N$ : numero di alleli medio,  $RA$ : ricchezza allelica media - In parentesi l'errore standard.

	$H$	$N$ : alleli	$RA$
ante 2005	0,727 (0,024)	8,4 (0,7)	8,2 (0,7)
post 2005	0,722 (0,024)	8,8 (0,8)	8,7 (0,8)

## Bibliografia

- Falconer D.S. (1989), Introduction to quantitative genetics, Longman Scientific & Technical: 72.  
 Goudet J. (1995), Journal of Heredity; 86(6): 485-486.  
 Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000), Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva.

# Verifica di un QTL per la resistenza ai nematodi identificato nel cromosoma 12 ovino attraverso la densificazione della mappa genetica e l'utilizzo di un'ulteriore generazione di discendenti



S. SECHI<sup>1</sup>, SARA CASU<sup>1</sup>, M.G. USAI<sup>1</sup>, G. MULAS<sup>1</sup>, G. SANNA<sup>2</sup>, A.P. PIPIA<sup>2</sup>,  
A. CARTA<sup>1</sup>, A. SCALA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Settore Genetica e Biotecnologie, DIRPA, AGRIS Sardegna - Agenzia per la Ricerca in Agricoltura  
07040 Olmedo (SS), Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Animale - Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Università di Sassari  
Via Vienna, 2 - 07100 Sassari

**Parole chiave:** nematodi gastrointestinali, QTL, microsatelliti.

**INTRODUZIONE** - Le strongilosi gastrointestinali sono uno dei principali problemi sanitari che condizionano l'allevamento ovino. Precedenti studi eseguiti su una popolazione sperimentale Sarda x Lacauine applicando un *daughter-design* hanno evidenziato l'esistenza di diverse zone del genoma (QTL) che influenzano la resistenza ai nematodi (Scala et al., 2002; Moreno et al., 2006). Con l'intento di confermare e precisare la localizzazione dei QTL precedentemente identificati, le regioni di interesse sono state densificate con l'aggiunta di ulteriori microsatelliti. Inoltre, al fine di aumentare la potenza del protocollo sperimentale e verificare la segregazione dei QTL trovati nella razza Sarda in purezza, un'ulteriore generazione di discendenti è stata creata accoppiando le pecore *backcross* con arieti di razza Sarda. L'obiettivo del presente lavoro è quello di confermare e meglio precisare la localizzazione di un QTL per la resistenza ai nematodi precedentemente identificato (Moreno et al., 2006) sul cromosoma 12 ovino utilizzando una mappa genetica più densa e integrando le informazioni ottenute dai dati molecolari e fenotipici delle due generazioni di discendenti.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati utilizzati i dati relativi a 968 pecore (BC) figlie di 10 arieti Sardo x Lacauine (F1) e 794 pecore (BCF) figlie di 476 pecore BC e di 18 arieti di razza Sarda. Il carattere scelto per la definizione della resistenza ai nematodi è stato la conta delle uova fecali (FEC). In seguito alla verifica del livello di infestazione con animali sentinella, i prelievi di feci e la conta delle FEC secondo la metodica di Raynaud (1970) sono stati realizzati sull'intero gregge periodicamente: in media 2 volte all'anno per le BC e 1 volta all'anno per le BCF. I fenotipi per l'analisi di identificazione dei QTL sono stati i valori genetici stimati secondo il modello applicato da Sechi et al. (2009). Ai 5 microsatelliti del panel originario ne sono stati aggiunti ulteriori 12. Nella popolazione BC l'analisi dei nuovi marcatori è stata effettuata solo nelle famiglie informative mentre la popolazione BCF è stata completamente analizzata. Le analisi dei microsatelliti sono state eseguite in multiplex e simplex utilizzando un ABI PRISM® 3100 - Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). La discriminazione allelica per la determinazione dei genotipi individuali è stata realizzata con il software Genotyper® 3.0 (P.E. Biosystems, ABI Prism™). L'analisi dei QTL è stata effettuata utilizzando una regressione lineare entro famiglia del fenotipo sulla probabilità di ogni figlia (nipote) di aver ricevuto uno o l'altro segmento cromosomico del padre (nonno). La probabilità di ereditare un determinato allele del QTL è stata calcolata lungo tutto il cromosoma a intervalli di un cM. Le soglie di rigetto dell'ipotesi nulla sono state calcolate attraverso 10,000 permutazioni entro famiglia separatamente per le famiglie BC e BCF. L'intervallo di confidenza della posizione del QTL è stato calcolato attraverso 10,000 *bootstrappings*.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La porzione di cromosoma investigata include il 98% della lunghezza totale con una distanza media tra microsatelliti di  $6.26 \pm 5.57$  cM (93% e  $23.75 \pm 13.90$  cM nella mappa precedente). L'inclusione delle informazioni molecolari della popolazione BCF ha determinato un aumento del contenuto informativo, calcolato come  $\sum_{ij} |p_{ij1} - p_{ij2}|$  dove  $p_{ijk}$  è la probabilità per la discendente  $j$  di ereditare uno o l'altro ( $k=1$  o  $2$ ) segmento cromosomico del padre

(nonno)  $i$ , del 42% in media lungo l'estensione del cromosoma. Un QTL significativo a livello di cromosoma ( $P$ -value=0.0002) è stato individuato nella posizione più probabile di 61 cM dall'inizio del cromosoma tra i marcatori McM507 e MNS57. Quattro delle 10 famiglie analizzate sono risultate significative. Gli effetti di sostituzione allelica stimati variavano tra 0.47 e 0.97 unità di deviazione standard residua (u.d.s.r.). L'intervallo di confidenza al 90% è risultato tra 17 e 100 cM corrispondente all'80% della lunghezza del cromosoma considerato. I precedenti risultati sulla popolazione BC ottenuti con i 5 microsatelliti del panel originario (Moreno et al., 2006) avevano identificato un QTL per la resistenza ai nematodi in posizione 87 cM dall'inizio del cromosoma ( $P$ -value=0.0096). L'inclusione delle informazioni fenotipiche e molecolari delle nipoti e il conseguente incremento delle meiosi informative ha consentito di confermare con un livello di significatività superiore la presenza di un QTL per la resistenza ai nematodi gastrointestinali sul cromosoma 12. Al contrario, non si è ottenuta una maggiore precisione della localizzazione del QTL. Migliori risultati in questo senso sono attesi dalla tipizzazione dell'intera popolazione con l'Illumina Ovine SNP50 BeadChip, attualmente in corso.

*Il lavoro è stato finanziato nell'ambito del progetto "APQ per la ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica, progetto P5a - Attivazione del Centro di biodiversità animale per la valorizzazione del patrimonio animale con riferimento alla produzione e alla ricerca al servizio dell'allevamento" della Regione Sardegna.*

## ■ Verification of a QTL for nematode resistance on OAR 12 using a denser map and further generation of descendants

**Key words:** nematodes, QTL, microsatellites.

## Bibliografia

- Moreno C.R., Gruner, L., Scala, A., Mura, L., Schibler, L., Amigues, Y., Sechi, T., Jacquet, P., Francois, D., Sechi, S., Roig, A., Casu, S., Barillet, F., Brunel, J.C., Bouix, J., Carta, A., Rupp, R., 2006. QTL for resistance to internal parasites in two designs based on natural and experimental condition of infection. Proc. 8th WCGALP, Communication 15-05.
- Gruner.
- Raynaud, J.P., 1970. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 45:321-342.
- Scala, A.; Carta, A.; Ligios, S.; Barillet, F.; Gruner, L., 2002. Resistenza genetica ai nematodi g.i. degli ovini: ricerca di QTL sul cromosoma 3. Atti XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 11-14 Settembre 2002, Cagliari, Italia, 46.
- Sechi S., Salaris S., Scala A., Rupp R., Moreno C., Bishop S.C., Casu Sara, 2009. Estimation of (co)variance components of nematode parasites resistance and somatic cell count in dairy sheep. Ital. J. Anim. Sci. vol. 8 (Suppl. 2), 156-158.

# Contenuto in cellule somatiche nel latte di capre primipare di razza Sarda e Maltese



C. SPANU, N. DE RIU, C. SCARANO, V. SPANU, F. COSSU, P. SEDDA, G. MONIELLO, E. DE SANTIS

Dipartimento di Biologia Animale, Università degli studi di Sassari

**Parole chiave:** Contenuto in Cellule Somatiche, infezione intramammaria, capra di razza Sarda, capra di razza Maltese.

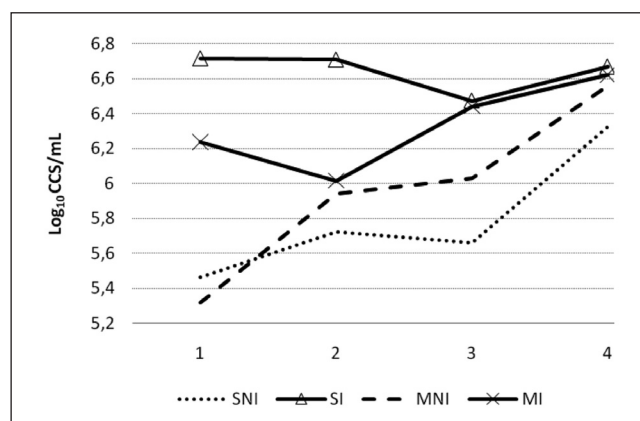
**INTRODUZIONE** - Il Contenuto in Cellule Somatiche (CCS) del latte di capra è influenzato dallo stato sanitario della mammella e da altri fattori, quali il *management*, la razza, il numero e lo stadio di lattazione, il livello della produzione, il numero di mungiture giornaliere, le infezioni da CAEV e l'estro (McDougall and Voermans, 2002; Luengo et al., 2004; Paape et al., 2007). Nel secreto di emimammelle non infette il valore medio del CCS assume nella capra valori più elevati rispetto a quanto rilevato in bovini ed ovini (Paape et al., 2007). In questa specie le mastiti subcliniche hanno prevalenza compresa tra il 20,0% e 35,0%. Queste patologie sono determinate da infezioni intramammarie (IMI), sostenute principalmente da Stafilococchi Coagulasi Negativi (SCN), *Streptococcus* spp, *S. aureus* (Contreras et al., 2003). Il presente lavoro si propone di valutare il rischio di IMI e l'evoluzione del CCS in gruppi sperimentali di capre primipare di razza Sarda e Maltese.

**MATERIALE E METODI** - La ricerca è stata condotta presso due aziende (A e B) a conduzione semi-estensiva. In ciascuna azienda venivano allevati in condizioni omogenee due gruppi sperimentali di capre primipare, uno di razza Sarda (n=12) e uno di razza Maltese (n=12), iscritte ai rispettivi libri genealogici. Dopo l'allontanamento dei capretti, sono stati prelevati dagli animali campioni di latte di emimammella con frequenza mensile, da Aprile a Luglio (a una distanza media dal parto di 35, 65, 95 e 125), nel corso della mungitura della sera. Un campione di latte prelevato sterilmente veniva utilizzato per l'esame batteriologico (NMC, 1999) ed un campione veniva inviato al laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna per la determinazione del CCS mediante citofluorimetria di flusso. La quantità di latte prodotto veniva misurata nelle due mungiture giornaliere. Il confronto dei dati di prevalenza delle IMI tra le due razze nei 4 campionamenti, è stato effettuato mediante Fisher's Exact Test. La misura del rischio di nuove IMI nelle due razze è stata valutata per ciascuna data di campionamento mediante la determinazione dell'*Odds Ratio* (OR). L'effetto di diversi fattori sulla probabilità di nuove IMI è stato valutato mediante regressione logistica. La variabile dicotomica dipendente era rappresentata dalla probabilità di avere emimammelle con nuove IMI ed è stata stimata secondo il modello Logit ( $\pi_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 \text{Razza}_i + \beta_2 \text{Data campionamento}_j + \beta_3 \text{Allevamento}_k + e_{ijk}$ ), dove  $\beta_0$  rappresenta l'intercetta e  $e_{ijk}$  l'effetto residuo. L'effetto dei fattori sperimentali sul  $\log_{10}$  CCS è stato valutato tramite il seguente modello lineare generalizzato (GLM):  $\log_{10} \text{SCC} = \mu + \text{infezione}_i + \text{Razza}_j + \text{Allevamento}_k + \text{numero mungiture}_l + \text{Data campionamento}_m + \text{produzione latte}_n + e_{ijklm}$ , dove  $\mu$  rappresenta la media ed  $e$  l'effetto residuo. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante software Statgraphics Plus vers. 16.0.09 (Centurion).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nel corso della lattazione sono stati effettuati 4 campionamenti e prelevati in totale 380 campioni di emimammella. La durata della lattazione e la produzione totale erano di (media $\pm$ ds) 146 $\pm$ 9 giorni e 162 $\pm$ 49kg per la razza Maltese, 126 $\pm$ 16 giorni e 85 $\pm$ 36kg per la Sarda. I picchi massimi di produzione registrati erano di kg 317 e 203 rispettivamente per la razza Maltese e Sarda. In Tabella 1 è riportata la prevalenza di emimammelle infette per razza e per campionamento. La prevalenza delle IMI nelle capre di razza Maltese è costantemente più alta rispetto alle capre di razza Sarda ( $P<0,05$ ). Il 6,5% dei casi di IMI è riferibile a *S. aureus* mentre il 70,4% a SCN, le cui specie più rappresentate erano *S. caprae* (50,5%), *S. chromogenes* (15,9%), *S. simulans* (9,4%). La probabilità (OR) di nuove IMI nelle capre Maltesi è maggiore rispetto alle capre di razza Sarda, rispettivamente di 6,7 volte nel 1° campionamento, 5,0 nel 2°, 6,5 nel 3° e 2,7 nel 4°. La probabilità di nuove IMI nella razza Maltese è maggiore rispetto alla Sarda (OR 4,9,  $P<0,001$ ), influenzata dall'allevamento (OR 2,8,  $P<0,01$ ) ma non dalla data di campionamento ( $P>0,05$ ). Il CCS del latte è stato influenzato dall'infezione, razza, numero di mungiture, data di campionamento e produzione ( $P<0,001$ ), mentre non è influenzato dall'allevamento.

**Tabella 1** - Prevalenza di emimammelle infette nelle due razze per campionamento.

Razza	Campionamento			
	1	2	3	4
Maltese	12,50	18,75	33,33	30,43
Sarda	2,08	2,00	6,00	8,00
P	<0,05	<0,01	<0,001	<0,01



**Figura 1** - CCS nel latte di emimammella di capre primipare di razza Sarda e Maltese in relazione allo stato sanitario.

SNI = razza Sarda Non Infetta; SI = razza Sarda, Infetta; MNI = razza Maltese, Non Infetta; MI = razza Maltese, Infetta.

mento. Il CCS medio nell'intera lattazione è 6,21  $\log_{10}$ /mL nel latte di capre di razza Maltese (n= 188) e 5,98  $\log_{10}$ /mL nelle capre di razza Sarda (n= 192). Il CCS medio nel latte di emimammelle non infette è 5,92  $\log_{10}$ /mL nel latte di capre Maltesi e 5,79  $\log_{10}$ /mL in quello di capre Sarde ( $P>0,05$ ). Nel latte di emimammelle infette il CCS è 6,61  $\log_{10}$ /mL per le capre Sarde e 6,38  $\log_{10}$ /mL per le Maltesi ( $P>0,05$ ). L'evoluzione del CCS per singolo campionamento è riportato in Figura 1. Il CCS medio risulta più elevato ( $P<0,05$ ) per le emimammelle con IMI (6,3  $\log_{10}$ /mL) rispetto a quello delle non infette (5,89  $\log_{10}$ /mL). I risultati ottenuti nelle nostre condizioni di allevamento suggeriscono una differente suscettibilità della razza Sarda e Maltese alle IMI. In accordo con Gomes et al. (2006) evidenziano che il CCS nel latte di capra è influenzato dallo stato sanitario della mammella e da fattori di natura non infettiva tra cui, in particolare, lo stadio di lattazione.

Lavoro eseguito con finanziamento RAS - azione P5A.

## Milk Somatic Cell Counts in primiparous goats of Sarda and Maltese breeds

**Key words:** Somatic Cell Count, intramammary infection, Sarda goat breed, Maltese goat breed.

## Bibliografia

- Contreras A., et al. (2003), Livest Prod Sci; 79: 273-283.  
 Luengo C., et al. (2004), J Dairy Res; 71:169-174.  
 McDougall S., Voermans M. (2002), J Dairy Sci; 85:378-383.  
 Paape M.J., et al. (2007), Small RumRes; 68(1-2):114-125.  
 Gomes V., et al. (2006), Small RumRes; 64: 30-34.

# Antibiotico resistenza di ceppi di *S. aureus* isolati da latte di capra allevata in Sardegna



V. SPANU, S. VIRDIS, C. PENNA, E. MURA, C. SPANU, C. SCARANO, E. DE SANTIS

Dipartimento di Biologia Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale,  
Università degli Studi di Sassari - 07100 Sassari

**Parole chiave:** antibiotico resistenza, *S. aureus*, latte di capra, Minima Concentrazione Inibente (MIC).

**INTRODUZIONE** - *Staphylococcus aureus* (SA) può mostrare resistenza singola o multipla nei confronti degli antibiotici. I ceppi meticillino-resistenti (MRSA) causano in pazienti umani infezioni contraddistinte da elevato tasso di mortalità (Das et al., 2007). Gli MRSA, il cui isolamento è da tempo segnalato in medicina umana e veterinaria, possono risultare resistenti nei confronti di altre Penicilline naturali e semisintetiche, della Vancomicina, dei Macrolidi e della Tetraciclina. La segnalazione di MRSA è prevalente in medicina umana, particolarmente in ambito nosocomiale, ma l'interesse verso questi ceppi si è esteso anche al settore veterinario. Gli animali e gli allevamenti possono costituire siti di selezione o potenziali serbatoi di MRSA, che possono poi pervenire all'uomo anche attraverso la catena alimentare. La filiera del latte, considerata l'elevata frequenza di isolamento di SA dal latte di allevamento, può essere esposta alle contaminazioni e al trasferimento di MRSA, particolarmente quando orientata verso produzioni a latte crudo (Viridis et al., 2010). Lo scopo del presente lavoro è quello di identificare ceppi di SA provenienti da latte di capra di allevamento e di studiare, dal punto di vista fenotipico e genotipico, il profilo di resistenza verso i più comuni antibiotici utilizzati nella pratica veterinaria e umana.

**MATERIALI E METODI** - In 26 aziende caprine situate nel Sud-Ovest della Regione Sardegna, sono stati effettuati 2 differenti prelievi (100 mL) di campioni di latte di *tank* refrigerato per la ricerca degli Stafilococchi Coagulasi Positivi (SCP). La ricerca e la conta degli SCP è stata effettuata secondo la metodica UNI EN ISO 6888-1/2. Le colonie di SCP con caratteristiche tipiche venivano isolate in purezza su *Brain Heart Infusion* (BHI) agar e tipizzate mediante procedure microbiologiche standard. Da 40 campioni SCP+ prelevati da 20 allevamenti, sono stati selezionati 40 ceppi, tutti appartenenti alla specie SA. L'identificazione fenotipica è stata confermata mediante la ricerca della subunità *gyrA*, girasi specifica di SA. Sui 40 ceppi selezionati è stata saggiata la resistenza agli antibiotici (Tabella 1) AMP, AMX, CF, CFP, CRO, OB, E, OX, P, TE e VA, mediante microdiluzione in brodo (CLSI 2006a). In relazione alle Minime Concentrazioni Inibenti (MICs), sono state valutate la moda, il range, la MIC<sub>50</sub>, la MIC<sub>90</sub> e definita la sensibilità, rapportando le MICs ai *breakpoints* di riferimento (CLSI 2006b). Dai ceppi

isolati si è proceduto inoltre ad estrarre il DNA (De Buyser et al., 1989) e a determinare, mediante specifici protocolli PCR, la presenza dei geni responsabili della resistenza alla Meticillina (*mecA*; Rizzotti et al., 2005), Eritromicina (*ermA*; Rizzotti et al., 2005), Vancomicina (*vanA-B*; Rizzotti et al., 2005),  $\beta$ -lattamici (*blaZ*; Rizzotti et al., 2005) e Tetraciclina (*tetK-L-M-S-W*; López et al., 2008).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I 40 ceppi, identificati come SA sulla base della presenza del gene *gyrA* e del profilo biochimico-metabolico, producevano TDNase, coagulasi libera e legata. In Tabella 1 sono riportate la MIC<sub>50</sub>, la MIC<sub>90</sub>, la moda e il range delle MIC rilevate per gli antibiotici testati. Tutti i ceppi di SA sono risultati sensibili nei confronti di 10 degli 11 antibiotici saggiati e le MIC<sub>90</sub> sono risultate per tutti gli antibiotici inferiori ai rispettivi *breakpoints*. Solamente 2 ceppi (5%), isolati in campioni di latte dello stesso allevamento, hanno mostrato resistenza nei confronti della TE (MIC=128  $\mu$ g/mL). La resistenza alla TE è stata confermata dalla presenza nei 2 isolati del gene plasmidico *tetK*. Nessuno degli SA isolati ha mostrato resistenza nei confronti degli antibiotici beta-lattamici (PEN, AMP, AMX, OB, OX, CF, CFP, CRO), della E e della VA. Nei ceppi sensibili agli antibiotici beta-lattamici, il gene *mecA* è risultato assente. Dei ceppi saggiati, 2 sono risultati *blaZ*+ e non esprimevano resistenza nei confronti degli antibiotici sensibili alle beta-lattamasi (AMP, AMX e PEN). I risultati del presente studio, evidenziano che SA isolato da latte di capra presenta uno spettro di resistenza agli antibiotici piuttosto ridotto. Questi dati vengono in parte confermati da altri lavori eseguiti su SA isolato da latte di *tank* di capra (Moroni et al., 2005) e di vacca (Hata et al., 2008). La resistenza agli antibiotici risulta più frequente in SA isolato da infezioni intramammarie della capra (Viridis et al., 2010), della pecora e della bovina (Tueber, 1999). Nessun ceppo presenta inoltre resistenza alla VA, antibiotico comunemente utilizzato in medicina umana per il trattamento di infezioni sostenute da MRSA.

Lavoro eseguito con fondi FAR 2009.

## Antibiotic resistance of *S. aureus* strains isolated from raw goat milk produced in Sardinia

**Key words:** antibiotic resistance, *S. aureus*, goat milk, Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

**Tabella 1** - MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, moda e range ( $\mu$ g/mL) di 11 antibiotici nei confronti di ceppi di SA isolati da latte massale di capra.

Antibiotici	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Moda	Range
AMP <sup>1</sup>	0,12	0,25	0,12	0,06-0,25
PEN <sup>2</sup>	0,6	0,12	0,06	0,06-0,12
AMX <sup>3</sup>	0,25	0,5	0,25	0,12-1,0
OX <sup>4</sup>	0,25	0,25	0,25	0,12-0,5
TE <sup>5</sup>	4,0	4,0	4,0	1,0-128,0
CF <sup>6</sup>	0,25	0,25	0,25	0,06-0,5
E <sup>7</sup>	0,12	0,25	0,06	0,06-0,5
VA <sup>8</sup>	1,0	2,0	1,0	0,5-2,0
OB <sup>9</sup>	0,25	0,25	0,25	0,12-1,0
CFP <sup>10</sup>	4,0	8,0	4,0	2,0-8,0
CRO <sup>11</sup>	4,0	8,0	4,0	4,0-8,0

<sup>1</sup> Ampicillina, <sup>2</sup> Penicillina, <sup>3</sup> Amoxicillina, <sup>4</sup> Oxacillina, <sup>5</sup> Tetraciclina, <sup>6</sup> Cefalotina, <sup>7</sup> Eritromicina, <sup>8</sup> Vancomicina, <sup>9</sup> Cloxacillina, <sup>10</sup> Cefoperazone, <sup>11</sup> Ceftriaxone.

## Bibliografia

- Clinical and Laboratory Standard Institute (2006a), doc.M7-A7.  
Clinical and Laboratory Standard Institute (2006b), doc.M100-S16.  
Das I., O'Connell N., Lambert P. (2007), Journal of Hospital Infection; 65:117-123.  
De Buyser M.L., Morvan A., Grimont F. and El Solh N. (1989), Journal of General Microbiology; 135: 989-999.  
Hata E., Katsuda K., Kobayashi H., Nishimori K., Uchida I., Higashide M., Ishikawa E., Sasaki T., Eguchi M. (2008), Journal of Dairy Science; 91:564-569.  
López A.C., De Ortúzar R.V.M., Alippi A.M. (2008), Revista argentina de microbiología; 40: 231-236.  
Moroni P., Pisoni G., Vimercati C., Rinaldi M., Castiglioni B., Cremonesi P., Boettcher P. (2005), Journal of Dairy Science; 88:3500-3509.  
Rizzotti L., Simeoni D., Cocconcini P., Gazzola S., Dellaglio F., Torriani S. (2005), Journal of Food Protection; 68, 955-965.  
Tueber M. (1999), Cellular and Molecular Life Sciences; 56:755-763.  
Viridis S., Scarano C., Cossu F., Spanu V., Spanu C., De Santis E.P.L. (2010), Veterinary Medicine International; 2010:1-6.



# Caratteristiche spermatiche epididimali di razze ovine venete



C. STELLETTA<sup>1</sup>, N.S. JUYENA<sup>1</sup>, A. CALABRIA<sup>1</sup>, N. TORMEN<sup>2</sup>, V. BONDESAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di scienze Cliniche Veterinarie

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Animali

<sup>3</sup> Veneto Agricoltura

**Parole chiave:** seme, epididimo, razze a numerosità ridotta.

**INTRODUZIONE** - La conservazione di razze ovine autoctone rappresenta una sfida moderna per mantenere la biodiversità delle specie di interesse zootecnico. Oltre che considerare la normale raccolta con vagina artificiale e/o elettroeiaculazione ed il congelamento del seme esistono metodi che valorizzano i soggetti maschi che sono destinati alla macellazione attraverso la raccolta ed il congelamento del seme epididimale. A questo livello gli spermatozoi si ritrovano nell'ultimo stadio di maturazione e possono essere suddivisi in dipendenza dello sito di prelievo. L'epididimo può essere suddiviso empiricamente in testa, corpo e coda. Gli spermatozoi raccolti nei tre siti hanno caratteristiche specifiche e possono rappresentare una buona fonte di materiale biologico utilizzabile per le biotecnologie applicate alla riproduzione ed alla selezione genetica. Scopo del lavoro è quello di identificare le caratteristiche seminali epididimali pre e post congelamento di razze venete a numerosità ridottissima.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati seguiti durante la macellazione 12 soggetti di razza Alpagota (4), Brogna (4), Foza (2) e Lamon (2) di età variabile di 2-8 anni in stagione non riproduttiva. I testicoli immediatamente raccolti sono stati trasportati a temperatura ambiente in laboratorio immersi in soluzione fisiologica. Gli epididimi, separati dai testicoli, sono stati suddivisi empiricamente in tre porzioni: testa (H), corpo (B) e coda (T). Di ogni porzione è stata effettuata la raccolta degli spermatozoi attraverso il taglio dei tubuli seminiferi e l'aggiunta di un mestruo di mantenimento. È stata valutata la concentrazione iniziale (Conc), la motilità iniziale (Mot.In), la risposta al test di osmolarità (HOST), la motilità dopo aggiunta di glicerolo al 7% come crioprotettore (Mot.crio), le anomalie morfologiche della testa e della coda (AT e AC), numero di dosi congelabili con una concentrazione di  $400 \times 10^3$ /ml (NUM). Il congelamento è stato effettuato ponendo le paillettes da 0,25 ml su vapori d'azoto per 5 minuti e successivamente l'immersione nello stesso azoto. La motilità post-scongelo (Mot. post) e le caratteristiche cinetiche degli spermatozoi (Progressività, VAP, VSL, VCL, ALH, STR) sono state valutate tramite l'utilizzo di un sistema computerizzato di analisi spermatica.

**RISULTATI** - Sono stati considerati un totale di 23 testicoli perché un soggetto di razza Alpagota risultava essere criptorchide. È stata evidente la differenza tra le diverse porzioni considerate. Scarsi risultati sono stati ottenuti con le porzioni B e H. I risultati dei parametri ottenuti per T, suddivisi per razza sono riportati in Tabella 1.

**CONSIDERAZIONI** - Il metodo di raccolta spermatica a livello epididimale risulta essere una buona alternativa alla classica quando si hanno necessità di macellazione dei soggetti. La porzione epididimale più idonea al congelamento risulta essere quella della coda dove gli spermatozoi hanno raggiunto la quasi completa maturazione. La diffusa scarsa motilità progressiva evidenziata post-scongelo può essere attribuita alla mancanza del contatto con il plasma seminale ed alla sta-

**Tabella 1** - Caratteristiche pre e post congelamento di spermatozoi della coda epididimale di razze venete a numerosità ridotta.

	ALPAGOTA	BROGNA	FOZA	LAMON
Conc	1058±670	1286±762	1419±845	1037±417
Mot.In	65,7±19,6	69,3±17,6	68,75±8,5	75±12,2
HOST	53,7±15	66,9±7,6	69,5±6,2	67,7±4,3
Mot.Crio	45,7±20,5	48,7±12,7	53,7±13,8	53,7±4,8
AT	3,8±2,3	7,2±4,8	2,6±0,1	2,3±0,1
AC	19,5±4,8	16±4,1	9,7±2,2	10,7±2,2
NUM	23,2±11,1	10,1±5	12,7±3	12±4,7
Mot.post	20,2±20,5	19,8±12,7	9,75±13,8	12±4,8
Progressiv	10±7,8	7,6±7,4	7±0,1	0
VAP	67,9±45,4	69,2±47,7	88,4±61,8	0
VSL	50,2±42,8	52,3±43,8	64,9±56,9	0
VCL	109,3±60	104,4±48,1	129,4±78	0
ALH	13,2±7,1	13,05±7,5	17,6±9,2	0
STR	46,5±15,7	55,7±15,7	76±20	0

Conc: concentrazione  $\times 10^6$  SPZ/ml; Mot.In: Motilità pre-trattamento %; HOST: test di risposta all'iposmolarità %; Mot.Crio: motilità dopo trattamento con crioprotettore; AT e AC: anomalie morfologiche %; NUM: numero di paillettes congelabili; Mot post: Motilità post scongelamento %; Progressiv: % spermatozoi progressivamente motili; VAP: Velocity average path; VSL: Velocity straight line; VCL: Velocity curvilinear; ALH: amplitude of lateral head displacement; STR: straightness.

gione. Ulteriori studi che considerino l'inseminazione artificiale per via laparoscopica e/o la produzione embrionale *in vitro* potranno mettere in evidenza il grado di capacità fertilizzante del seme epididimale.

## ■ Epididimal sperm characteristics of endangered ovine breeds from Veneto

**Key words:** semen, epididimal, endangered breeds.

## Bibliografia

Barbas J.P., Mascarenhas S.D. (2009) Cell Tissue Bank. Feb;10(1):49-62.  
Note: Attività finanziata dalla Regione Veneto, L.R. 40/03, art. 69, Progetto GENETIP.

# Influenza del tipo di salatura sulle caratteristiche del Pecorino Siciliano DOP



M. TODARO<sup>1,2</sup>, G. TORNAMBÈ<sup>1</sup>, F. MAZZA<sup>1</sup>, S. PASSALACQUA<sup>2</sup>,  
A. MUNÌ<sup>3</sup>, S. SANGIORGI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo. - Sezione di Produzioni Animali - Università di Palermo

<sup>2</sup> Azienda casearia Passalacqua - Castronovo di Sicilia (PA)

<sup>3</sup> Assessorato Regionale delle Risorse Agricole e Alimentari - UOS Cammarata (AG)

**Parole chiave:** salatura, formaggi, Pecorino Siciliano DOP.

**INTRODUZIONE** - Il Pecorino Siciliano è stato definito il più antico formaggio d'Europa<sup>1</sup>, alcuni cenni della sua esistenza sono infatti riscontrabili nell'Odissea di Omero. È un formaggio a Denominazione di Origine Protetta con un Disciplinare di produzione (GURI 295 del 22-12-1955) che prevede l'uso di latte crudo, una salatura esclusivamente a secco ed una stagionatura di almeno 4 mesi. Indagini preliminari hanno evidenziato che il Pecorino Siciliano presenta una ampissima variabilità nella quantità di sale, che non è normata dal Disciplinare di Produzione. Con l'obiettivo di standardizzare, nonché di diminuire, la quantità di sale in questo formaggio è stato messo a punto un protocollo di salatura alternativo alla salatura a secco.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio ha previsto la realizzazione di due tipologie di salatura dei formaggi (Secco e Mista) che hanno riguardato le due più comuni tipologie di produzione del Pecorino Siciliano DOP: la forma da 6 e da 12 kg. La salatura a secco ha previsto due "mani" di sale: la prima "mano" dopo 48 h dalla fabbricazione, nella quale è stato distribuito il 3% del peso del formaggio di NaCl a grana media; la seconda "mano" è stata data dopo 15 d distribuendo sulla forma l'1% di sale. La tipologia di salatura mista ha invece previsto una salatura in salamoia satura dopo 24 h dalla fabbricazione per un tempo di 48 h per le forme da 12 kg e di 12 h per le forme da 6 kg; successivamente ai formaggi è stata data una "mano" di sale pari all'1%. Durante i primi due mesi di stagionatura, i formaggi ottenuti con entrambe le modalità di salatura sono stati spazzolati a secco e, all'occorrenza, con una soluzione satura di sale per liberarli dalle muffe formatesi naturalmente in questa fase. I parametri di stagionatura sono stati: per i primi 30 giorni, in cella alla temperatura di 16°C e 85% di UR e successivamente in grotta ad una temperatura di 16°C e 90% di UR. Complessivamente sono state utilizzate 60 forme, 30 di 12 kg e 30 di 6 kg provenienti da 3 caseifici aziendali delle province di Agrigento e Trapani. Le 30 forme per ciascuna pezzatura hanno subito un diverso trattamento di salatura. Dopo 5 mesi di stagionatura tutti i formaggi sono stati tagliati e sottoposti ad analisi chimica centesimale, per la determinazione di grasso, N totale, N solubile, NaCl e ceneri. È stato calcolato l'indice di maturazio-

ne come rapporto fra N solubile e N totale. I formaggi sono stati sottoposti a test di resistenza alla compressione (INSTRON 5000), ed alla misura del colore (CIEL\*a\*b\*) con cromometro Minolta CR-300. I formaggi di entrambe le pezzature, ottenuti con le due modalità di salatura sono stati oggetto di un test triangolare per evidenziarne le differenze di tipo organolettico. L'analisi statistica dei dati è stata condotta con un modello misto di ANOVA per misure ripetute: il caseificio (1...3) come fattore individuale fisso, l'interazione tipologia di peso (6 e 12 kg) per salatura (Secco, Mista) e come misura ripetuta il numero di forme per ciascuna tesi (1...5).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Le analisi chimiche sui Pecorini hanno evidenziato la presenza di una discreta variabilità nelle percentuali di grasso e proteine in funzione del produttore. Relativamente agli effetti del tipo di salatura sulle caratteristiche chimiche, va evidenziato come non siano state riscontrate differenze significative né tra le forme da 6 kg né fra quelle da 12 kg. Leggere differenze si sono evidenziate fra le due tipologie di peso: le forme da 12 kg hanno infatti presentato valori di sostanza secca inferiori, risultando così più umide e con una più elevata percentuale di azoto solubile, che ha determinato un innalzamento dell'indice di maturazione ed una minore quantità di sale di circa mezzo punto percentuale.

Fra i tre indici di misura del colore emerge con chiarezza che i formaggi da 12 kg salati a secco hanno presentato un indice del giallo (b\*) più elevato rispetto a tutte le altre tipologie di formaggio ed una maggiore luminosità (L\*) rispetto ai formaggi di uguale pezzatura sottoposti a salatura mista. Tali aspetti potrebbero essere legati ad una diversa attività biologica dei microrganismi implicati nel processo di stagionatura delle forme da 12 kg salate a secco. La resistenza alla compressione è stata superiore per le forme da 6 kg ed in particolare per quelle con salatura a secco. Questo è probabilmente dovuto ad una maggiore durezza della pasta del formaggio causata dalla maggiore perdita d'acqua in relazione al maggiore rapporto volume/superficie della forma da 6 kg e per la tipologia di salatura che potrebbe avere richiamato una maggiore quantità di acqua dal formaggio risultando così più resistente alla compressione strumentale. Il test triangolare non ha raggiunto la significatività per i confronti 12 kg secco vs 12 kg misto e per 12 kg secco vs 6 kg secco mentre ha presentato una significatività pari a 0,01 per il confronto 12 kg misto vs 6 kg misto ed a 0,001 per quello 6 kg secco vs 6 kg misto. Questo sembra evidenziare che il tipo di salatura influenza le caratteristiche sensoriali percepite nelle forme di minore dimensione mentre non sortisce effetti su quelle di dimensione maggiore e che il sistema misto di salatura abbia maggiore effetti rispetto alla salatura a secco.

*Ricerca condotta con fondi del progetto di filiera Zootecnica da latte "Sostegno alla stagionatura del Pecorino Siciliano DOP". Finanziamento Regione Siciliana - Assessorato Regionale Risorse Agricole Alimentari e Forestali.*

## ■ Effect of the type of salting on Pecorino Siciliano cheese characteristics

**Key words:** cheese salting, cheese characteristics, Pecorino Siciliano PDO.

**Tabella 1** - Parametri qualitativi del Pecorino Siciliano DOP.

	6 kg		12 kg	
	Mista	Secco	Mista	Secco
S.S. (%)	65,6 Aa	67,0 Ab	63,6 Bc	65,0 Ba
Proteine (%)	44,3 A	44,3 A	46,4 B	45,0 A
N Solub. (%)	1,7 a	1,6 a	2,0 b	1,8 ab
In. Mat. (%)	23,9	23,1	26,9	25,9
Es. Eter. (%)	43,4	43,3	42,6	43,4
NaCl (%)	3,7 ab	4,0 a	3,1 b	3,5 ab
Ceneri (%)	9,9	10,2	9,1	9,7
L*	73,9 ab	72,2 a	73,3 ab	75,1 b
a*	4,6	4,8	4,7	4,8
b*	11,9 a	11,2 a	12,0 a	13,2 b
SC <sup>1</sup> 30%	0,12	0,13	0,09	0,08
SC <sup>1</sup> 40%	0,22 ab	0,26 b	0,18 a	0,17 a

<sup>1</sup> Stress da compressione (N/mm<sup>2</sup>).

Sulla riga lettere maiuscole differenti indicano una significatività per P<0,01, lettere minuscole per P<0,05.

## Bibliografia

- Betta P., Cantarelli F. (2002), Dal Mito alla storia, il Pecorino Siciliano. Ed. CO.RE.R.A.S. Palermo.

# Influenza del genotipo per l'alfa (s1)-caseina sulla qualità del latte di capre Maltesi



M. TODARO<sup>1</sup>, A. DI GRIGOLI<sup>1</sup>, G. TORNAMBÈ<sup>1</sup>, P. DI GREGORIO<sup>2</sup>,  
P. GIACCONE<sup>1</sup>, A. BONANNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo. - Sezione di Produzioni Animali - Università di Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali - Università della Basilicata

**Parole chiave:** alfa (s1)-caseina; qualità del latte, capre Maltesi.

**INTRODUZIONE** - I numerosi studi sui polimorfismi lattoproteici della capra hanno evidenziato per il gene che codifica per l'alfa (s1)-caseina (CSN1S1) 17 alleli: A, B1, B2, B3, B4, C, D, E, F, G, O1, O2, H, I, L, M, N. Tali alleli sono stati associati a differenti tassi di sintesi di caseina e classificati in quattro gruppi quantitativi: alleli forti (A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, M) intermedi (E ed I) e deboli (D, F e G) che sintetizzano rispettivamente un alto (circa 3,5 g/l), medio (circa 1,1 g/l), e basso (0,45 g/l) quantitativo di alfa (s1)-caseina, più alleli nulli (O1, O2 e N) che non sintetizzano alfa (s1)-caseina<sup>1,2</sup>. Le varianti genetiche per l'alfa (s1)-caseina influenzano in misura più o meno marcata anche altri componenti del latte. Il latte di capre portatrici di alleli forti presenta maggiori percentuali di caseina, grasso, calcio e fosforo, minore diametro delle micelle caseiniche e pH più basso, aspetti che nell'insieme influenzano positivamente la consistenza e la velocità di formazione del coagulo<sup>1,2</sup>. È stato inoltre evidenziato che individui omozigoti AA producono un latte caratterizzato da un sapore e un odore irco meno intenso rispetto a individui omozigoti FF<sup>3</sup>. Recentemente è emerso che il polimorfismo al locus CSN1S1 influenza la composizione acidica del grasso del latte e in particolare gli acidi grassi a media catena e quelli derivanti dall'attività enzimatica della delta-9 desaturasi. Differenze significative sono riportate a carico degli acidi grassi saturi da C8 a C12 e per gli acidi palmitico, stearico, linoleico, oleico e rumenico (CLA); inoltre la maggior parte dei rapporti tra gli acidi grassi indicatori dell'attività della delta-9 desaturasi risultano influenzati dall'alfa (s1)-caseina<sup>4</sup>. Scopo della ricerca è stato quello di evidenziare le influenze del genotipo al locus CSN1S1 sulla quantità e sulla qualità del latte di capre di razza Maltese.

**MATERIALI E METODI** - Al fine di costituire gruppi geneticamente omogenei, un nucleo di capre di razza Maltese è stato tipizzato al locus CSN1S1 secondo Ramunno et al.<sup>5</sup>. Sulla base del genotipo sono stati costituiti tre gruppi di 5 capre ciascuno (forte: AA e BB; intermedio: FA e FB; debole: FF) omogenei per data ed ordine di parto. Non sono stati riscontrati soggetti caratterizzati da forme genetiche nulle. Durante la fase sperimentale (dal 12 maggio al 9 giugno), le capre sono state condotte quotidianamente su un pascolo naturale, nell'intervallo tra le due mungiture (dalle ore 9 alle ore 15). Al rientro in stalla, al termine della mungitura, è

stata fornita loro un'integrazione di 300 g/d di concentrato costituito per il 20% da fava schiacciata e per l'80% da orzo e del fieno di vecchia *ad libitum*. Con cadenza settimanale sono stati eseguiti 5 controlli individuali durante i quali è stata rilevata la produzione giornaliera di latte, prelevando un campione di 50 ml di latte per le analisi volte alla determinazione di grasso, proteine, lattosio, cellule somatiche (CCS) e acidi grassi liberi con il metodo all'infrarosso, pH, acidità titolabile (°SH/50 ml) per titolazione, urea con metodo enzimatico e parametri elastometrici a mezzo Formagraph, mentre è in corso di definizione la composizione acidica del grasso del latte. L'analisi statistica è stata condotta con un modello misto di ANOVA con i fattori fissi genotipo (forte, intermedio, debole) e giorno del controllo (1...5); le medie sono state testate con il *t* di Student.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La produzione giornaliera di latte e la percentuale di grasso non hanno presentato differenze significative fra i gruppi. Al contrario differenze sono emerse a carico del contenuto in proteine totali e in caseina, che hanno evidenziato un trend negativo passando dal genotipo forte a quello debole, in accordo con l'ampia letteratura in materia. L'indice caseinico si è comunque ridotto esclusivamente nel latte delle capre con genotipo debole. Relativamente al contenuto in urea del latte, è emerso come le capre del gruppo forte presentino un valore significativamente più elevato, lasciando supporre un effetto sulla utilizzazione della proteina alimentare.

Contrariamente a quanto riportato in letteratura sull'influenza del genotipo sulla percentuale di lattosio nel latte, sono emerse influenze statisticamente significative fra i tre gruppi di capre. Tale fenomeno potrebbe essere legato al diverso livello produttivo dei tre gruppi per la nota correlazione positiva con la produzione giornaliera di latte.

Anche i parametri fisici considerati sono stati influenzati dal genotipo indagato: il pH e l'acidità titolabile del latte del gruppo debole sono risultati rispettivamente più alto e più basso degli altri gruppi. La maggiore acidità del latte del gruppo intermedio ha influenzato il tempo di coagulazione, che è risultato più basso rispetto al latte degli altri due gruppi. Il latte del genotipo forte si è fortemente differenziato da quello degli altri genotipi per la maggiore consistenza del coagulo (a 30), attribuibile al maggiore contenuto in caseina del latte.

Ricerca finanziata con fondi PRIN 2007B4JBWN.

**Tabella 1** - Parametri qualitativi del latte in funzione del genotipo.

	Forte	Intermedio	Debole
Latte (g/d)	2053	2237	1955
Grasso (%)	3,78	3,73	3,58
Proteine (%)	3,67 Aa	3,47 Bb	3,31 Bc
Caseina (%)	2,72 A	2,56 B	2,39 C
Indice caseinico	0,74 A	0,74 A	0,72 B
Urea (mg/dl)	30,69 A	25,97 B	28,51 AB
Lattosio (%)	4,51 b	4,69 a	4,45 c
CCS (Log10)	6,06	5,89	5,86
pH	6,67 ab	6,63 b	6,68 a
Acidità (°SH/50ml)	3,06 ab	3,14 a	2,89 b
r (min)	12,34 A	9,98 B	12,97 A
K <sub>20</sub> (min)	1,96	1,78	1,74
a 30 (mm)	32,10 A	18,74 B	20,01 B
AG lib. (mmol/10kg)	1,38	1,56	1,44

## ■ Effect of goat's alpha-s1 casein genotype on milk quality characteristics

**Key words:** alfa (s1)-casein; milk quality, Maltese goat.

## Bibliografia

- Grosclaude F., Mahé M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. (1987). A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha$ s1-casein. *Genetic Selection Evolution*, 19, 399-412.
- Mahé M.F., Grosclaude F. (1993). Polymorphism of  $\beta$ -casein in the Creole goat of Guadeloupe: evidence for null allele. *Genetics Selection Evolution*, 25, 403-408.
- Remeuf, F. (1993) Influence du polymorphisme génétique de la caséine alfa-s1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait*, 73, 549-557.
- Chilliard Y., Roullé, Leroux C., (2006). Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9-desaturation ration. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 474-487.
- Ramunno L., Cosenza G., Pappalardo M., Pastore N., Gallo D., Di Gregorio P., Masina P. (2000). Identification of the goat CSN1S1 F allele by means of PCR-RFLP method. *Animal Genetics* 31, 333-346.

# Sieroprevalenza di *Coxiella burnetii* in ovicapri della provincia di Bergamo



V. TRANQUILLO, A. GAFFURI, E. TESTA, F. PATERLINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
Sezione diagnostica di Bergamo

**Parole chiave:** *Coxiella burnetii*, ovicapri, sierologia, Febbre Q.

**INTRODUZIONE** - L'infezione da *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*), agente causale della Febbre Q, è endemica nei ruminanti domestici (bovini, ovini e caprini) nella maggior parte degli stati dell'Unione Europea (UE). Sebbene l'infezione negli animali sia comune, la malattia è rara. La Febbre Q è una zoonosi che ha un limitato impatto sulla salute pubblica in UE, eccetto sotto certe condizioni epidemiologiche e per particolari categorie a rischio. La recente epidemia di Febbre Q in Olanda ha visto nel 2009 il coinvolgimento di 2357 casi umani. Le indagini epidemiologiche ancora in corso suggeriscono che la principale fonte di contagio per gli essere umani è rappresentata dagli allevamenti caprini in cui si sono verificati epidemie di aborto e in particolare per le persone che risiedono in un raggio di 5 km da tali allevamenti.

A seguito del rinnovato interesse su questa zoonosi la Commissione Europea ha richiesto all'EFSA un'opinione scientifica sulla Febbre Q al fine di determinare: 1-la reale entità in termini di diffusione della malattia e infezione nella UE; 2-valutare i fattori di rischio associati all'occorrenza di casi di Febbre Q nell'uomo e la persistenza nei ruminanti domestici; 3-valutare l'efficacia e l'efficienza di diverse strategie per il controllo della malattia.

In Italia numerosi Autori (Capuano F., et al. 2004), hanno dimostrato la diffusione di *C. burnetii* nei ruminanti domestici con prevalenze variabili dal 2% al 14%. Si tratta comunque di dati derivanti da studi osservazionali in aree ben definite che non appartengono a sistemi di monitoraggio e o sorveglianza strutturati.

La provincia di Bergamo dal punto di vista zootecnico si caratterizza anche per la presenza di un patrimonio ovicaprino rilevante. Sono presenti sul territorio provinciale

**830** allevamenti di ovini e **1016** di caprini, per un ammontare di **35000** mila capi ovini e **12000** mila caprini. Considerando quindi l'importante diffusione di questi ruminanti domestici nel nostro territorio e la scarsità d'informazioni relative alla diffusione di *C. burnetii*, si è ritenuto importante condurre una prima indagine volta a sfruttare la disponibilità dei sieri provenienti dalla bonifica sanitaria sia degli ovini che dei caprini, per verificare la circolazione, nella popolazione animale di ovicapri, dell'infezione.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta mediante un campionamento completamente randomizzato effettuato sulla popolazione di sieri caprini e ovini conferiti, alla sezione diagnostica di Bergamo, nell'arco del 2009 per la bonifica sanitaria. Si è optato per un campionamento in grado di fornire informazioni sulla circolazione di *C. burnetii* nella popolazione animale sulla base della presenza di anticorpi sierici mediante l'utilizzo di un test ELISA. La dimensione del campione è stata calcolata ipotizzando una prevalenza di capi sieropositivi pari al 50%, in assenza di informazioni sulla diffusione dell'agente nella popolazione, una precisione della stima del 5% e un livello di confidenza del 95%. È stata generata una lista di randomizzazione che ha permesso di selezionare i sieri, che sono stati distribuiti in piastre da 96 pozzetti e sottoposti ad Elisa indiretta mediante il kit IDVET ID Screen® Q Fever Indirect. Sulla base dei valori di DO ottenuti si è proceduto al calcolo del valore di S/P che ha permesso di classificare i sieri in positivo, negativo, dubbio in accordo a quanto indicato dal produttore del kit.

Si è proceduto quindi alla stima puntuale ed intervallare (I.C. al 95%) della prevalenza di capi positivi al test ELISA.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Complessivamente è stato analizzato il sangue di 368 ovini e 368 caprini.

Sono risultati positivi **37** campioni di sangue caprino pari ad una prevalenza del **10%** (IC 95%: 7-14); 3 campioni sono risultati dubbi. Sono risultati positivi **43** campioni di sangue ovino pari ad una prevalenza del **13%** (IC 95%: 8-16); 7 campioni sono risultati dubbi.

Per la modalità di costituzione del campione i risultati sopra riportati vanno letti esclusivamente in un'ottica di diffusione a livello di popolazione animale e non forniscono alcuna informazione sulla diffusione dell'infezione da *C. burnetii* in allevamento e tra allevamenti.

Il dato risulta coerente con quanto riportato nella Scientific Opinion dell'EFSA in cui dall'analisi critica della letteratura disponibile (Arricau-Bouvery N and Rodolakis A, 2005) risulta che in un campione di 2155 capre raccolti tra il 1999 e il 2002 è stata stimata una prevalenza del 13% (IC 95% 11,2-14,0); mentre nella stessa indagine su 7194 campioni di sangue ovino è stata stimata una prevalenza del 9% (IC 95%: 8,4-9,7). Questi risultati fanno riferimento alla popolazione ovicaprina della Sardegna. Per quanto i risultati da noi ottenuti siano sovrapponibili a quello di altri Autori, riteniamo comunque che forniscano una sottostima della reale diffusione nelle rispettive popolazioni da noi indagate. Lo Scientific Opinion dell'EFSA, sulla scorta delle evidenze scientifiche disponibili, suggerisce infatti che un risultato negativo alla sierologia non garantisce l'assenza d'infezione. Questi risultati indicano una circolazione importante dell'agente causale della Febbre Q e hanno fornito il supporto per approfondire la situazione epidemiologica; sono in corso presso la sezione diagnostica di BG, studi sulla diffusione intra-allevamento, la diffusione tra allevamenti e le relazioni con gli allevamenti bovini, tutte importanti fonti di dati necessari per la valutazione quantitativa del rischio zoonotico di Febbre Q.

## ■ Seroprevalences of *C. burnetii* in sheep and goat population of Bergamo province

**Key words:** *Coxiella burnetii*, small ruminant, Q Fever, Serosurvey.

## Bibliografia

- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever. EFSA Journal 2010; 8(5):1595.[114 pp]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595. Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu).
- Van der Hoek W., Dijkstra F., Schimmer B., Schenéeberger P.M., Vellema P., Wijkmans C., ter Schegget R., Hackert V., van Duynhoven Y. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. Euro Surveill. 2010;15(12):pii=19520. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19520>.
- Capuano F., Parisi A., Cafiero M.A., Pitaro L., Fenizia D.: *Coxiella burnetii*: quale realtà? Parassitologia 46: 131-134. 2004.
- Arricau-Bouvery N., Rodolakis A. Is Q Fever an emerging zoonosis? Vet. Res. 36 (2005) 327-349.



# Studio dell'espressione del gene Stearoyl-CoA desaturasi nelle cellule somatiche del latte di capre allevate con il sistema biologico



R. TUDISCO<sup>1</sup>, S. CALABRÒ<sup>1</sup>, M.I. CUTRIGNELLI<sup>1</sup>, G. MONIELLO<sup>2</sup>, M. GROSSI<sup>1</sup>, O.J. GONZALEZ<sup>1</sup>, V. PICCOLO<sup>1</sup>, F. INFASCELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti - Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Animale - Università di Sassari

**Parole chiave:** capra, latte, Stearoyl-CoA desaturasi, CLA.

**INTRODUZIONE** - Lo studio di peculiari caratteristiche degli alimenti in grado di svolgere un ruolo favorevole nei riguardi della salute umana suscita notevole interesse nella comunità scientifica internazionale. Particolare attenzione viene rivolta ai coniugati dell'acido linoleico (CLA) presenti nel latte, nei prodotti lattiero caseari e nelle carni dei ruminanti, per le loro riconosciute proprietà antiossidative e anticarcinogene. I CLA sono prodotti intermedi dei processi di bioidrogenazione degli acidi linoleico e  $\alpha$ -linolenico nel rumine, e secondo le più recenti ricerche, sono sintetizzati anche per via endogena a partire dall'acido trans vaccenico (trans-11 C18:1) ad opera della Stearoyl-CoA desaturasi (SCD) (Bauman and Griinari, 2003). Inoltre, il contenuto di CLA nel latte sembra essere fortemente influenzato dalla dieta degli animali (Parodi, 1999). Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare, in funzione dell'adozione del sistema di allevamento biologico, i livelli di espressione della SCD nelle cellule somatiche del latte di capra, come suggerito da Feng et al. (2007) in alternativa all'impiego di campioni di tessuto mammario.

**MATERIALI E METODI** - Trenta capre pluripare gravide ( $50 \pm 2.5$  kg PV) sono state suddivise in due gruppi (S e B) omogenei per numero di parti e latte prodotto nella precedente lattazione. Dopo il parto, il gruppo S è stato alimentato in stalla con fieno di erba medica (16.0% s.s.) e con un mangime concentrato del commercio (PG 18% s.s.; 1.03 UFL/kg s.s.). Il gruppo B ha avuto libero accesso al pascolo (ore 9.00-16.00) e, rientrato in stalla, riceveva un mangime concentrato con le stesse caratteristiche chimiche di quello precedente, ma costituito da materie prime derivanti da coltivazioni certificate biologiche. La somministrazione del mangime concentrato per entrambi i gruppi è stata gradualmente aumentata in lattazione fino a 700 g/capo/giorno. Campioni di pascolo, erba medica e dei due mangimi concentrati sono stati analizzati mensilmente (AOAC, 2000; Van Soest et al., 1991). Il valore nutritivo è stato calcolato secondo il metodo INRA (1978). Nei primi 60 giorni dopo il parto il latte è stato destinato all'alimentazione dei capretti; successivamente la produzione di latte è stata monitorata mensilmente e campioni rappresentativi di latte (5 prelievi) sono stati analizzati per i contenuti di proteine, grassi e lattosio mediante Milko Scan 133B (Foss Matic) tarato per latte di capra. Per la determinazione del profilo acidico e del contenuto in CLA del latte si rimanda a D'Urso et al. (2008). Per lo studio dell'espressione genica, l'mRNA è stato estratto da cellule somatiche di latte mediante kit Pure Link RNA extraction (Invitrogen), retrotrascritto mediante kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen) e analizzato mediante RT-PCR semiquantitativa per la determinazione del contenuto di mRNA trascritto dal gene SCD. I livelli relativi dei vari trascritti nel latte del gruppo B sono stati espressi, dopo normalizzazione rispetto all'espressione di un gene housekeeping (Ciclofillina), rispetto a quelli corrispondenti del gruppo S. I dati sperimentali sono stati analizzati mediante procedura GLM (SAS, 2000).

**Tabella 1** - Contenuto in grasso (%) e di alcuni acidi grassi (g/100 g di grasso) nel latte.

	S	B	SEM
Grasso	3.79 B	4.60 A	0.52
C18:0	11.30 A	7.05 B	5.80
C18:1	18.06 B	20.05 A	8.77
C18:2	1.01	1.19	1.82
c9c11CLA	0.011 b	0.015 a	$6.9 \times 10^{-4}$
t10c12CLA	0.024 B	0.030 A	$9.2 \times 10^{-4}$
$\Sigma$ CLA	0.46	0.53	0.023

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Mentre la produzione di latte non è risultata diversa tra i gruppi, i contenuti in grasso, C18:1, C18:2 e gli isomeri *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *cis*-11 CLA hanno mostrato valori significativamente più elevati nel latte del gruppo B (Tabella 1). Le concentrazioni minori di CLA nel latte del gruppo S sarebbero da attribuire all'impiego di fieno di medica come base foraggera, e quindi alla perdita di precursori durante il processo di fienagione (Aii et al., 1988). Inoltre, nelle cellule somatiche del latte prodotto dal gruppo allevato con il sistema biologico, l'espressione del gene SCD è risultata significativamente superiore rispetto a quella rilevata per il gruppo allevato in stalla ( $1.5 \pm 0.5$  vs  $0.39 \pm 0.11$ ;  $P < 0.01$ ).

## ■ Influence of organic breeding system on Stearoyl-CoA desaturasi gene expression in goat milk

**Key words:** goat, Milk, Stearoyl-CoA desaturasi, CLA.

## Bibliografia

- Aii, T., Takahashi, S., Kurihara, M., Kune, S. (1988), Jpn. J. Zotech. Sci. 59, 718-724.
- A.O.A.C. (2000), Official methods of Analysis 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M. (2003). Annu. Rev. Nutr., 23: 203-227, 2003
- D'Urso, S., Cutrignelli, M.I., Calabro, S., Bovera, F., Tudisco, R., Piccolo, V., Infascelli, F. (2008). J. Anim. Phys. Anim. Nutr. 92: 405-410.
- Feng S., Salter A.M., Parr T., Garnsworthy PC (2007). J. Dairy Sci., 90: 4128-4136.
- Parodi, P.W. (1999), J. Dairy Sci; 82:1339-1349.
- SAS (2000). SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 8.1.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991), J. Dairy Sci.; 74: 3583-3598.

# Isolamento di *Brucella* spp. in allevamenti ovini e caprini siciliani nel triennio 2007-2009



D. VICARI, L. GALUPPO, S. MARINEO, L. LIPARI, V. RANDAZZO, S. CARACAPPA

Istituto Zooprofilattico Della Sicilia "A. Mirri" - Via G. Marinuzzi, 3 - Palermo

**Parole chiave:** *Brucella* spp., Sicilia, specie ovina e caprina, allevamenti ovini e caprini.

**INTRODUZIONE** - La brucellosi è una zoonosi, malattia infettiva contagiosa, a decorso cronico, sostenuta da batteri appartenenti al genere *Brucella*, particolarmente diffusa nei paesi del Mediterraneo.

*Brucella* spp. è un batterio Gram negativo, a forma coccobastoncellare, aerobio, asporigeno, non capsulato e immobile. Il suo optimum di crescita è 37°C al 5-10% CO<sub>2</sub>. Inoltre è in grado di resistere per oltre trenta giorni alla putrefazione, mentre è inattivata in pochi minuti dai comuni disinfettanti<sup>1</sup>. Essa rappresenta un importante problema di sanità pubblica ed è considerata malattia professionale. Ogni anno vengono infatti riportati circa 500.000 casi di infezione<sup>2</sup>. In Italia, nell'anno 2007, sono stati riportati 179 casi di Brucellosi di cui 50 solo nella regione Sicilia<sup>3</sup>. La brucellosi è inoltre causa di gravi danni economici, particolarmente nelle aree agro-pastorali ed è responsabile di ipofertilità ed infertilità, aborti tardivi, metriti e altre forme a localizzazione diversa. La regione Sicilia, al contrario di altre regioni italiane, è tra quelle non indenni dalla brucellosi che continua a essere presente in allevamenti ovini e caprini. Il ruolo dei piccoli ruminanti è particolarmente importante in quanto sono considerati "animali serbatoio". Nonostante le misure adottate nel tempo, sin dagli anni '60 con i piani di bonifica, negli anni '80 con piani di profilassi e nel 1992 con il piano di eradicazione stabilito dal D.M. 453, la regione Sicilia rimane tra le regioni dove la malattia è endemica<sup>4,5</sup>. Con l'emanazione del piano straordinario, a seguito dell'ordinanza 14 Novembre 2006, si stabiliscono misure ancora più restrittive per l'eradicazione della Brucellosi. Con la presente nota si riportano i risultati degli esami di campo e microbiologici effettuati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia nel corso del triennio 2007-2009.

**MATERIALI E METODI** - I campioni sono stati prelevati da milza, linfonodi, testicoli, utero, placenta ecc. in sede di macellazione, da capi positivi ai test sierologici mentre altre matrici (aborti, latte, tamponi vaginali, prepuziali) provenivano da allevamenti con patologie riferibili alla sfera riproduttiva durante sopralluoghi effettuati congiuntamente con i veterinari che operano nel territorio. Gli isolamenti sono stati effettuati secondo la POS-DIA20 OIE. Tutti i ceppi di *Brucella* spp. isolati sono stati tipizzati e inviati successivamente al Centro di Referenza Nazionale per le brucellosi.

**RISULTATI** - Nel triennio preso in considerazione in questa indagine sono state interessate tutte le provincie siciliane. È stato scelto questo periodo in quanto successivo all'introduzione del Piano straordinario per l'eradicazione della brucellosi ovina e caprina. Il numero degli allevamenti sottoposti a controllo è schematizzato in Tabella 1 dove sono indicati anche i risultati degli esami effettuati. I risultati ottenuti dalle diverse matrici sono riportati nella Tabella 2 dove si evidenzia che il numero degli esami effettuati ha subito un leggero decremento. Gli esami da organi sono sempre successivi alla positività degli esami sierologici, di conseguenza il decremento del numero degli esami effettuati, seppur leggero, sembra essere un segnale incoraggiante per una futura eradicazione della brucellosi dalla regione Sicilia. La tipizzazione dei ceppi, effettuata presso il centro di riferimento nazionale, ha mostrato che, nel triennio 2007-2009, tutte *Brucelle* isolate appartenevano al biovar 3 di *Brucella melitensis*. Questa prevalenza era già stata osservata in studi precedenti<sup>6,7</sup>.

**Tabella 1** - Allevamenti presi in esame e risultato degli esami effettuati.

Allevamenti	Anno			Totali
	2007	2008	2009	
Positivi	31	34	28	93
Negativi	389	285	351	1025
<b>Totali</b>	<b>420</b>	<b>319</b>	<b>379</b>	<b>1118</b>

**CONSIDERAZIONI** - L'adozione delle misure straordinarie, quali l'individuazione di aree problema, di aziende problema, tempi medi di rientro in aziende infette, la costituzione di una task force, hanno permesso di monitorare la quasi totalità degli allevamenti siciliani con l'individuazione di ulteriori focolai. Inoltre, le nuove modalità di rientro nelle aziende problema hanno consentito l'adozione tempestiva di misure necessarie per la risoluzione di focolai di malattia.

**CONCLUSIONI** - Con la presente nota abbiamo voluto evidenziare che l'eradicazione della Brucellosi deve necessariamente passare da: un controllo sierologico (con entrambe le metodiche ufficiali, SAR e FDC) su tutti i capi presenti nel territorio; un'anagrafe certa mediante boli ruminanti; l'individuazione ed eliminazione dei focolai storici; il rientro in stalla entro 30 giorni. È necessaria inoltre l'individuazione dei capi falsi positivi e falsi negativi e la tipizzazione dei ceppi batterici. Possiamo quindi concludere che, molto verosimilmente, se il piano straordinario continuerà a coinvolgere tutti gli attori (allevatori, operatori del settore, sanitari, forze dell'ordine e consumatori) in tempi brevi sarà possibile debellare questa patologia.

## ■ *Brucella* spp. isolation from ovine and caprine sicilian farms in three year period 2007-2009

**Key words:** *Brucella* spp., Sicily, ovine and caprine species, ovine and caprine farms.

## Bibliografia

- AA.VV (2008) OIE Manual of Diagnostic Tests and vaccines for Terrestrial Animals 6th edition Chapter 2.4.3. par.B 1.b; 2.7.2. par.B 1.
- Seleem M.N., Boyle S.M., Sriranganathan N. (2010) Vet Microbiol. 140 (3-4):392-8.
- Ministero della salute, bollettino epidemiologico 2007 ([www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)).
- Piccio D., Verso M.G., Lacca G., Mangiapane N., Caracappa S., Vitale F., Vesco G. (1999). Med Lav. 1999 Nov-Dec; 90(6):786-90.
- Balbo S.M., Vesco G., Caracappa S. (1989) XI International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologists and specialists in infectious diseases. Pg. 108.
- Vicari D., Arcigli A., Piraino C., Lo Verde V., Fianconaro M., Percipalle M., Ferrantelli V. (2005) Atti- International Research Conference for Brucellosis in small Ruminants. Pg. 53.
- Caracappa S., Vitale F., Vesco G., Stira S., La Farina M., Reale S. (1996) Atti della Società Italiana di Buiatria. Pg. 335-339.

**Tabella 2** - Tabella riepilogativa delle matrici e dei risultati ottenuti nel triennio 2007-2009 per la ricerca di *Brucella* spp.

Matrice	2007			2008			2009		
	Eseguiti	Positivi	Negativi	Eseguiti	Positivi	Negativi	Eseguiti	Positivi	Negativi
Latte	693	7	686	337	14	323	510	13	497
Linfonodo	26	5	21	226	61	165	223	32	191
Mammella	123	8	115	550	63	487	505	89	416
Milza	1652	99	1553	634	115	519	674	108	566
Testicolo	19	1	18	23	1	22	8	2	6
Utero	290	55	235	643	101	542	512	86	426
Feto (organi)	58	6	52	24	0	24	14	1	13
Altre matrici	378	15	363	379	48	331	250	16	234
<b>Totale esami</b>	<b>3239</b>	<b>196</b>	<b>3043</b>	<b>2816</b>	<b>403</b>	<b>2413</b>	<b>2696</b>	<b>347</b>	<b>2349</b>

**Sessione poster**

# Episodio di gozzo di probabile origine nutrizionale in un gregge del centro Italia



F. AGNETTI<sup>1</sup>, R. AGOSTINI<sup>2</sup>, E. MANUALI<sup>1</sup>, C. BARTOLINI<sup>1</sup>, P. MANCINI<sup>1</sup>, M. STORACI<sup>1</sup>, F. TONUCCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Pesaro

<sup>2</sup> ASUR Marche ZT2, Urbino

**Parole chiave:** gozzo, tiroide, iodio, ovini.

**INTRODUZIONE** - La carenza nutrizionale di iodio è una condizione facilmente verificabile sia in ambito umano che animale. Si stima che circa un miliardo di persone sono esposte al rischio di malattie derivanti da carenza di iodio e che oltre il 12% della popolazione mondiale viva in aree povere di iodio<sup>1</sup>. Fra gli animali, si riscontra soprattutto nei ruminanti, specialmente nei soggetti giovani, spesso neonati; anche gli adulti possono però andare incontro a forme subcliniche, responsabili di riduzione delle capacità produttive, aborti ed elevata mortalità neonatale<sup>2</sup>. Lo iodio è il costituente degli ormoni tiroidei; la sua carenza porta alla formazione del gozzo poiché la scarsità di tiroxina stimola la produzione di ormone tireotropo da parte della ghiandola pituitaria, con conseguente iperplasia della tiroide. Accanto al gozzo, sintomi diagnostici indicativi sono la presenza di aborti e/o natimortalità ed alopecia<sup>3</sup>. Un elemento diagnostico efficace risulta la determinazione del contenuto di iodio nel sangue; inoltre, nella pecora, ulteriori dati indicativi possono essere livelli di iodio nel latte inferiori a 80 µg/l<sup>2</sup>. In zootecnia, il metodo più efficace di iodioprofilassi è l'utilizzo di mangimi arricchiti in iodio; tale pratica, soprattutto negli allevamenti bovini ed ovini da latte, ha un duplice vantaggio: aumenta la concentrazione di iodio nel latte e nei suoi derivati destinati al consumo umano e migliora sensibilmente la selezione e la capacità riproduttiva delle razze animali, aumentando anche la stessa produzione latte<sup>1</sup>. In alternativa, mettere a disposizione degli animali blocchi di sale iodato è un metodo efficace per fornire il giusto apporto di iodio nella dieta. Canonicamente, 0,8 mg/kg o 0,12 mg/kg di sostanza secca di alimento, sono le dosi raccomandate rispettivamente per pecore in lattazione ed agnelli<sup>3</sup>. Scopo del presente contributo è quello di descrivere un episodio caratterizzato dalla comparsa di gozzo in agnelli neonati, appartenenti ad un gregge allevato in provincia di Pesaro-Urbino.

**MATERIALI E METODI** - Il gregge oggetto di indagine, al momento della comparsa dei sintomi, era costituito da circa 450 capi, di razza Sarda, allevati al pascolo semibrado tutto l'anno. L'anamnesi clinica riportava episodi di aborto e natimortalità, nonché presenza in quasi tutti gli agnelli, di una severa tumefazione a livello della porzione ventrale della regione del collo. I pochi soggetti vivi alla nascita, venivano a morte nel giro di poche ore, con evidenti segni di dispnea. La tumefazione descritta era evidente in circa il 30% degli agnelli al momento nati nel gregge. Negli animali adulti, invece, non si è osservata sintomatologia clinica. Sugli agnelli pervenuti in laboratorio è stato effettuato l'esame autoptico, durante il quale sono stati raccolti campioni da destinare ad indagini istologiche.

**RISULTATI** - All'esame esterno, gli agnelli morti si presentavano in stato di nutrizione scadente, con anemia delle mucose apparenti ed alopecia della regione della testa; era inoltre presente una tumefazione a livello della porzione ventrale della regione del collo, caratterizzata da dimensioni variabili da una noce ad un'arancia, consistenza dura, im-

mobilità al tatto. Dopo scuoiamento, si è potuto osservare che la suddetta tumefazione era rappresentata da un tessuto il quale, per caratteristiche macroscopiche e localizzazione anatomica, era ascrivibile a quello tiroideo. L'esame delle cavità corporee (addominale e toracica) non ha messo in evidenza alterazioni macroscopiche significative. Dal punto di vista istologico, i campioni di tiroide esaminati hanno permesso di rilevare un gozzo diffuso parenchimatoso, con proliferazioni papillomatose che si proiettavano nella cavità follicolare, fino alla formazione di microcavità cistiche; si è evidenziata inoltre una riduzione del contenuto di sostanza colloidale, che è apparsa debolmente acidofila.

**CONSIDERAZIONI** - Come in altre realtà zootecniche, anche nel comparto ovi-caprino le malattie metabolico-nutrizionali possono spesso provocare perdite cospicue e condizionare l'insorgenza di patologie ad eziologia infettiva e/o infestiva. In particolare, la carenza prolungata di iodio nella razione alimentare può portare all'ipotiroidismo, che, durante l'accrescimento, è responsabile di alcuni problemi metabolici e neurologici<sup>4,5</sup>. Nel caso descritto, una regressione graduale della patologia si è avuta con la somministrazione agli animali di blocchi di sale iodato; il ritrovamento di agnelli morti con tumefazione del collo è progressivamente diminuito ad un livello di circa il 5%. Attualmente, risultano in corso indagini volte a monitorare il gregge (adulti) da un punto di vista ematologico, onde prevenire l'insorgenza di eventuali nuovi episodi clinici e di valutare l'eventuale necessità di ricorrere ad una somministrazione di iodio per via iatrogena.

## ■ Case of goitre by probable nutritional cause in a flock of Central Italy

**Key words:** goitre, thyroid, iodine, sheep.

## Bibliografia

1. Santeusano F. (2004). Lo iodio nell'alimentazione zootecnica: una strategia per affrontare i problemi provocati dalla carenza di questo elemento nell'uomo. Webzine sanità Pubblica Veterinaria ([www.spvet.it](http://www.spvet.it)), 23.
2. Morgante M. (2002). Malattie metabolico-nutrizionali degli agnelli. *Summa*, 19 (6): pag. 21-23.
3. Vrzgula L. (1991). Metabolic disorders and their prevention in farm animals. Elsevier, Amsterdam.
4. Clark R.G., Sargison N.D., West D.M., Littlejohn R.P. (1998). Recent information on iodine deficiency in New Zealand sheep flocks. *N. Z. Vet J.*, 46 (6): pag. 216-222.
5. Ferri N., Ulisse S., Aghini-Lombardi F., Graziano F.M., Di Mattia T., Russo F.P., Arizzi M., Baldini E., Trimboli P., Attanasio D., Fumarola A., Pinchera A., D'Armiento M., (2003). Iodine supplementation restores fertility of sheep exposed to iodine deficiency. *J. Endocrinol. Invest.*, 26 (11): pag. 1081-1087.



# Effetto dello stress acuto sulle performance produttive della pecora da latte



M. CAROPRESE<sup>1</sup>, M. ALBENZIO<sup>1</sup>, L. SCHENA<sup>1</sup>, R. MARINO<sup>1</sup>, A. SANTILLO<sup>1</sup>, A. SEVI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento PRIME, Università di Foggia

**Parole chiave:** benessere, pecore da latte, cortisolo, citochine.

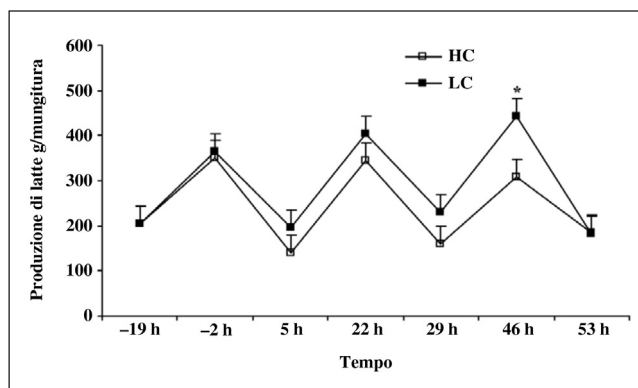
**INTRODUZIONE** - Gli animali domestici reagiscono a situazioni stressanti attraverso modificazioni fisiologiche che vedono il coinvolgimento del sistema nervoso centrale, del sistema endocrino ed immunitario, con conseguente alterazione delle performance produttive. Numerosi studi sugli ovini hanno dimostrato il peggioramento delle performance produttive a seguito di procedure di management aziendale stressanti per gli animali (Sevi et al., 2001; Caroprese et al., 2009). È noto che negli animali la risposta allo stress comporta l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), con successiva ipercortisolemia. L'aumento del cortisolo ematico può influenzare l'assetto immunitario degli animali, attraverso la modulazione della secrezione di citochine pro-infiammatorie (Black, 2002). Nella specie bovina è emersa l'esistenza, nell'ambito della stessa popolazione, di individui con diversi pattern fisiologici di risposta allo stress (Hopster et al., 1998). L'obiettivo del presente studio è stato quello di approfondire le relazioni tra i diversi gradi di risposta adrenocorticale ad uno stress acuto e le performance produttive della pecora da latte. Ulteriore obiettivo è stato quello di monitorare nel latte gli indicatori dell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, e dell'attivazione del sistema immunitario.

**MATERIALI E METODI** - Sono state selezionate 30 pecore di razza Comisana, di età compresa tra i 4 e i 6 anni, da un gregge allevato in maniera intensiva presso l'Istituto Italiano Sperimentale per la Zootecnica di Segezia, Foggia. Gli animali coinvolti nell'esperimento, sono stati individualmente sottoposti ad un test di isolamento della durata di 10 min. Subito prima del test d'isolamento, subito dopo di esso (a 10 min), e poi a 60, 120 e 300 min gli animali sono stati sottoposti ad un prelievo ematico al fine di valutare i livelli di cortisolo (Radim, Pomezia, Italia). Successivamente, sono stati selezionati due gruppi di animali da otto soggetti ciascuno, in base alla concentrazione di cortisolo misurata in corrispondenza del picco di secrezione: pecore con alta concentrazione di cortisolo (HC) aventi un picco >90 ng/mL e pecore con bassa concentrazione di cortisolo (LC), aventi un picco <80 ng/mL.

Il giorno prima e due ore prima del test di isolamento le pecore sono state munte. Successivamente al test di isolamento gli animali sono stati munti a distanza di 5, 22, 29, 46 e 53 ore. La produzione di latte è stata registrata ad ogni fine mungitura e i campioni di latte sono stati analizzati per la determinazione del pH, di grasso, proteine e lattosio, usando uno spettrofotometro a raggi infrarossi (Milkoscan 133B, Foss Electric, Hillerød, Denmark) in accordo con le procedure IDF (1990).

I parametri lattodinamografici sono stati misurati tramite il Formagraph (Foss Electric). La conta delle cellule somatiche (CCS) è stata effettuata usando il Foss Electric Fossomatic 90 (IDF, 1995). Un'aliquota di latte di ogni individuo è stata centrifugata a 2000 x g per 30 minuti a 4°C per separare il siero dal grasso e dalle cellule somatiche. Nel siero sono state determinate la concentrazione di cortisolo (Radim, Pomezia, Italia) e la concentrazione di IL-1β e di IL-6 mediante test ELISA secondo Caroprese et al. (2006). Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica ANOVA con il pacchetto statistico SAS (1999).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - In media le pecore del gruppo HC hanno presentato una concentrazione di cortisolo, in corrispondenza del picco di secrezione a 10 min, pari a  $119,3 \pm 11,8$  ng/mL, mentre i soggetti del gruppo LC hanno presentato una concentrazione media di cortisolo, in corrispondenza del picco, pari a  $52,4 \pm 11,8$  ng/mL. I soggetti del gruppo LC hanno prodotto in media più latte rispetto ai soggetti del gruppo HC ( $P < 0,05$ ; Fig. 1); inoltre, il latte delle pecore LC ha presentato in media un più basso contenuto in cellule somatiche rispetto al latte delle pecore HC ( $P < 0,05$ ). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i parametri nutrizionali, il pH e i parametri lattodinamografici. La produzione di latte, la percentuale di grasso, di proteine e lattosio, il CCS ( $P < 0,001$ ), la consistenza del coagulo e la velocità di formazione del coagulo ( $P < 0,05$ ) sono risultati essere influenzati dal tempo di raccolta dei campioni, in ragione dei differenti volumi di latte raccolti nella mungitura mattutina e po-



**Figura 1** - Produzione di latte (LSM±SEM) misurata a -19, -2, 5, 22, 29, 46, e 53 ore relativa al test di isolamento nelle pecore con alte (HC) e basse (LC) concentrazioni di cortisolo.

meridiana. Precedenti sperimentazioni avevano già evidenziato che l'aumento del cortisolo ematico può influire negativamente non solo sulla produzione di latte (Varner and Johnson, 1983; Hemsworth et al., 2000; Sevi et al., 2001), ma anche sulla sua qualità igienico-sanitaria, causando un incremento in cellule somatiche (Caroprese et al., 2009). Non sono emerse differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda la concentrazione di cortisolo nel latte. Nel latte prodotto dal gruppo HC la concentrazione di IL-1β e di IL-6 è risultata più alta rispetto al gruppo LC ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ). Sia l'IL-1β che l'IL-6 nel latte possono quindi essere considerate indicatori affidabili dell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Un'alta reattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è risultata anche associata ad una riduzione della produzione di latte e ad una predisposizione nello sviluppo di processi infiammatori a carico della ghiandola mammaria.

## ■ Effect of acute stress on production performance in dairy sheep

**Key words:** welfare, dairy ewe, cortisol, cytokine.

## Bibliografia

- Black, P.H. 2002. Stress and the inflammatory response: A review of neuro-genic inflammation. *Brain Behav. Immun.* 16:622-653.
- Caroprese, M., G. Annicchiarico, L. Schena, A. Muscio, R. Migliore, and A. Sevi. 2009. Influence of space allowance and housing conditions on the welfare, immune response and production performance of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 76:66-73.
- Caroprese, M., M. Albenzio, G. Annicchiarico, and A. Sevi. 2006. Changes occurring in immune responsiveness of single- and twin-bearing Comisana ewes during the transition period. *J. Dairy Sci.* 89:562-568.
- Hemsworth, P.H., G.J. Coleman, J.L. Barnett, and S. Borg. 2000. Relationship between human-animal interaction and productivity of commercial dairy cows. *J. Anim. Sci.* 78:2821-2831.
- Hopster, H., J.T.N. van der Werf, and H.J. Blokhuis. 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66:83-97.
- SAS User's Guide: Statistics. Version 8.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sevi, A., L. Taibi, M. Albenzio, A. Muscio, S. Dell'Aquila, and F. Napolitano. 2001. Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. *J. Anim. Sci.* 79:1457-1465.
- Varner, M.A., and B.H. Johnson. 1983. Influence of adrenocorticotropin hormone upon milk production, milk constituents, and endocrine measures of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 66:458-465.

# Effetto del verbascoside sui parametri ematici e produttivi in pecore Lacaune



D. CASAMASSIMA<sup>1</sup>, M. PALAZZO<sup>1</sup>, G. MARTEMUCCI<sup>2</sup>, F. VIZZARRI<sup>1</sup>, C. CORINO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise in Campobasso

<sup>2</sup> Dipartimento di Progettazione e Gestione dei Sistemi Agro-Zootecnici e Forestali, Università degli Studi di Bari

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** verbascoside, parametri ematici, latte, ovini.

**Tabella 1** - Produzione di latte in pecore di razza Lacaune.

Parametri	Gruppo C di controllo	Gruppo sperimentale V (10 mg/capo/d di verbascoside)	ES	Effetto, P		
				G	T	GxT
Soggetti n.	20	20				
Produzione totale di latte:						
0-20d kg	15,83 <sup>1</sup>	18,00 <sup>2</sup>	0,282	**		
20-40d kg	17,60	18,54	0,290	ns		
0-40d kg	33,43 <sup>1</sup>	36,54 <sup>2</sup>	0,531	**	/	/

ns = non significativo; \*P<0,05; \*\*P<0,01. Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono almeno per P<0,05 (1, 2). Sulla stessa colonna medie seguite da lettere diverse differiscono almeno per P<0,05 (a, b, c).

**Tabella 2** - Parametri ematici in pecore di razza Lacaune.

Parametri	Gruppo C di controllo	Gruppo sperimentale V (10 mg/capo/d di verbascoside)	ES	Effetto, P		
				G	T	GxT
Soggetti n.	20	20				
Trigliceridi:						
20d prima del parto mmol/l	0,25	0,24 <sup>a</sup>	0,004			
0d parto mmol/l	0,25	0,22 <sup>ac</sup>	0,005			
20d mmol/l	0,25 <sup>1</sup>	0,20 <sup>2b</sup>	0,006			
40d mmol/l	0,23 <sup>1</sup>	0,18 <sup>2b</sup>	0,006	**	*	*
Colesterolo totale:						
20d prima del parto mmol/l	1,89	1,92 <sup>a</sup>	0,013			
0d parto mmol/l	1,94 <sup>1</sup>	1,87 <sup>2</sup>	0,013			
20d mmol/l	1,93 <sup>1</sup>	1,82 <sup>2b</sup>	0,015			
40d mmol/l	1,93 <sup>1</sup>	1,81 <sup>2b</sup>	0,014	**	*	*
Colesterolo HDL:						
20d prima del parto mmol/l	0,71	0,70 <sup>a</sup>	0,011			
0d parto mmol/l	0,71	0,75 <sup>ab</sup>	0,011			
20d mmol/l	0,70 <sup>1</sup>	0,78 <sup>2b</sup>	0,014			
40d mmol/l	0,72 <sup>1</sup>	0,83 <sup>2bc</sup>	0,014	**	*	*
Colesterolo LDL:						
20d prima del parto mmol/l	1,07	1,11 <sup>a</sup>	0,016			
0d parto mmol/l	1,17 <sup>1</sup>	1,01 <sup>2b</sup>	0,017			
20d mmol/l	1,11 <sup>1</sup>	0,95 <sup>2bc</sup>	0,023			
40d mmol/l	1,09 <sup>1</sup>	0,90 <sup>2c</sup>	0,020	**	**	**
AST:						
20d prima del parto UI/L	63,43	62,92 <sup>a</sup>	0,365			
0d parto UI/L	62,06	61,53 <sup>ac</sup>	0,525			
20d UI/L	61,55	59,36 <sup>bc</sup>	0,572			
40d UI/L	61,06 <sup>1</sup>	54,25 <sup>2bd</sup>	0,839	**	*	*
Bilirubina:						
20d prima del parto μmol/l	8,24	8,23 <sup>a</sup>	0,274			
0d parto μmol/l	8,21	7,87	0,257			
20d μmol/l	8,21 <sup>1</sup>	7,52 <sup>2b</sup>	0,257			
40d μmol/l	8,21 <sup>1</sup>	7,18 <sup>2b</sup>	0,222	*	*	*

ns = non significativo; \*P<0,05; \*\*P<0,01. Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono almeno per P<0,05 (1, 2). Sulla stessa colonna medie seguite da lettere diverse differiscono almeno per P<0,05 (a, b, c, d).

**INTRODUZIONE** - È stato valutato l'effetto della somministrazione del verbascoside sullo stato ossidativo plasmatico e su alcuni parametri ematici e produttivi in pecore di razza Lacaune, durante il periodo del periparto.

**MATERIALI E METODI** - La prova, della durata di 60 giorni, ha avuto inizio da 20 giorni prima del parto fino a 40 giorni dopo ed è stata condotta su 40 pecore al 5° mese di gestazione. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi, di 20 soggetti ciascuno, di cui un gruppo C di controllo, che non ha ricevuto l'integratore alimentare e l'altro gruppo sperimentale V che ha ricevuto, nel mangime, un integratore allo 0,5% di verbascoside. La dose di integratore, nella misura di 2 g/capo/d, pari a 10mg di principio attivo, è stata assicurata quotidianamente ed individualmente con la somministrazione del mangime. Gli animali hanno ricevuto, durante il periodo di prova, mangime concentrato pellettato nella misura di 400 g/capo/d nel periodo che precedeva il parto e di 700 g/capo/d in quello successivo. La razione alimentare è stata completata, poi, con la somministrazione, *ad libitum*, di fieno di prato polifita. I controlli sperimentali hanno riguardato, prima del parto (20d), i pesi vivi e i prelievi ematici, mentre dopo il parto (0d, 20d e 40d), oltre ai rilievi citati, si sono aggiunti anche quelli relativi al *Body Condition Score* e alla produzione quanti-qualitativa di latte.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La somministrazione di verbascoside ha migliorato significativamente (P<0,01), del 9,3%, la produzione di latte (Tabella 1) e a livello ematico ha prodotto un significativo decremento (P<0,01) dei trigliceridi, del colesterolo totale, del colesterolo LDL, delle AST e della bilirubina (P<0,05) ed un marcato aumento (P<0,01) del colesterolo HDL (Tabella 2). Anche i parametri dello stato ossidativo plasmatico sono stati influenzati positivamente dall'impiego dell'integratore alimentare che ha determinato una significativa diminuzione dei ROMs (P<0,01) e dei TBARS (P<0,05) ed un aumento (P<0,01) delle Vitamine A ed E (Tabella 3). L'impiego del verbascoside, durante il periodo del periparto, ha determinato un miglioramento delle condizioni di benessere della pecora al parto che è stato evidenziato, a livello ematico, da una marcata riduzione dei ROMs e dei TBARS e, a livello produttivo, da una maggiore produzione di latte nel periodo immediatamente successivo al parto (0-20d).

**Effect of verbascoside on blood and productive parameters in Lacaune ewes**

**Key words:** verbascoside, blood parameter, milk, ovine.

**Tabella 3** - Alcuni parametri dello stato ossidativo plasmatico in pecore di razza Lacaune.

Parametri	Gruppo C di controllo	Gruppo sperimentale V (10 mg/capo/d di verbascoside)	ES	Effetto, P		
				G	T	GxT
Soggetti n.	20	20				
ROMs:						
20d prima del parto U/Carr	158,75 <sup>a</sup>	155,92 <sup>a</sup>	4,317			
0d parto U/Carr	239,88 <sup>1b</sup>	183,83 <sup>2b</sup>	8,622			
20d U/Carr	280,25 <sup>1c</sup>	136,44 <sup>2c</sup>	15,070			
40d U/Carr	335,05 <sup>1d</sup>	110,06 <sup>2d</sup>	20,491	**	**	**
TBARS:						
20d prima del parto μmol/l	0,190 <sup>a</sup>	0,186 <sup>a</sup>	0,009			
0d parto μmol/l	0,501 <sup>b</sup>	0,549 <sup>b</sup>	0,023			
20d μmol/l	0,247 <sup>ac</sup>	0,217 <sup>a</sup>	0,013			
40d μmol/l	0,288 <sup>1d</sup>	0,153 <sup>2a</sup>	0,014	*	**	*
Vit E:						
20d prima del parto ng/ml	0,137	0,135 <sup>a</sup>	0,005			
0d parto ng/ml	0,141 <sup>1</sup>	0,169 <sup>2ab</sup>	0,006			
20d ng/ml	0,143 <sup>1</sup>	0,210 <sup>2b</sup>	0,008			
40d ng/ml	0,140 <sup>1</sup>	0,234 <sup>2bc</sup>	0,011	**	*	*
Vit A:						
20d prima del parto ng/ml	0,144	0,143 <sup>a</sup>	0,007			
0d parto ng/ml	0,154	0,171 <sup>a</sup>	0,006			
20d ng/ml	0,136 <sup>1</sup>	0,189 <sup>2a</sup>	0,007			
40d ng/ml	0,136 <sup>1</sup>	0,253 <sup>2b</sup>	0,012	**	*	*

ns = non significativo; \*P<0,05; \*\*P<0,01. Sulla stessa riga medie seguite da numeri diversi differiscono almeno per P<0,05 (1, 2). Sulla stessa colonna medie seguite da lettere diverse differiscono almeno per P<0,05 (a, b, c, d).

# Analisi di elementi in traccia in campioni di latte ovino e caprino



A.E. CHIARAVALLE, G. MARCHESANI, M. MANGIACOTTI

Centro di Referenza Nazionale per la Radioattività nel Settore Zootecnico Veterinario - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - Foggia

**Parole chiave:** elementi in traccia, latte, ovino, caprino.

**INTRODUZIONE** - La qualità e la sicurezza degli alimenti sono strettamente legate all'inquinamento ambientale. L'incremento delle attività antropiche negli ultimi decenni ha suscitato negli organismi pubblici preposti alla tutela della salute della popolazione e dell'ambiente un crescente interesse nella valutazione del loro impatto al fine di poter intraprendere eventuali azioni correttive. L'accurata determinazione degli elementi chimici essenziali/tossici in matrici alimentari, riveste quindi un'importanza fondamentale costituendo un indispensabile strumento per una concreta valutazione da un lato delle proprietà nutrizionali dell'alimento e dall'altro dell'esposizione e del rischio per la salute dell'uomo. Nel presente lavoro sono stati indagati i livelli degli elementi in traccia, essenziali e tossici, presenti nel latte di due diverse specie: ovini e caprini, allevate a pascolo nel Parco Nazionale del Gargano al fine di: 1) approfondire le conoscenze scientifiche sul contenuto di elementi in traccia essenziali e tossici nei campioni di latte delle specie considerate; 2) determinare la variabilità dei valori di concentrazione all'interno della stessa specie e la differente concentrazione media interspecie; 3) valutare il profilo degli elementi essenziali (Fe, Co, Mn, Mo, Cu) e la composizione nutrizionale del latte preso in esame; 4) salvaguardare la salute dei consumatori determinando il tenore degli elementi tossici (As, Cd, Cr, Pb).

**MATERIALI E METODI** - In questo lavoro sono stati analizzati un numero complessivo di 63 campioni, 43 di latte ovino e 20 di latte caprino, prelevati da diversi allevamenti ubicati nel Parco Nazionale del Gargano, in tre diverse stagioni (autunno, inverno e primavera). Gli elementi essenziali indagati in questo studio sono il cobalto (Co), il rame (Cu), il ferro (Fe), il manganese (Mn), il molibdeno (Mo), il selenio (Se) e lo zinco (Zn), il cui ruolo è indispensabile e insostituibile nel biochimismo delle funzioni vitali dell'organismo umano. Tra gli elementi tossici, invece, sono stati considerati l'arsenico (As), il cadmio (Cd), il cromo (Cr) e il piombo (Pb) a causa della loro riconosciuta tossicità per la salute del consumatore. Ciascun campione, composto di almeno 500 ml di latte, è stato conservato esclusivamente in contenitori monouso di polietilene al fine di eliminare le principali fonti di contaminazione sia positive (rilascio del contenitore) che negative (perdite per adsorbimento).

La metodologia per la determinazione di tali elementi in traccia prevede che i campioni di latte, previa omogeneizzazione, siano sottoposti a digestione acida, con reagenti di elevato grado analitico (tipo ultrapur), in forno a microonde mod. Mars 5000-CEM. La soluzione ottenuta viene successivamente recuperata e portata a volume con acqua ultrapura in falcon da 50 ml ed infine analizzata con spettrometro modello ICP-MS-DRC II della Perkin-Elmer Inc. con cella dinamica di reazione, mediante curve di taratura, costruite con soluzioni multistandard degli analiti di interesse, a concentrazioni crescenti. L'ammoniaca è stata utilizzata come gas di reazione per l'eliminazione di specie poliatomiche interferenti nella determinazione di cromo e arsenico, mentre il meta-

no è stato usato per la determinazione del selenio. La metodologia utilizzata prevede l'uso di standard interni (Ittrio e Rodio), nelle soluzioni di taratura e nei campioni, per compensare le possibili fonti di variabilità sia strumentale che di composizione dei campioni. L'accuratezza e la precisione dell'intera procedura analitica sono state testate con l'ausilio di materiale di riferimento certificato (BCR 063R e NIST 1549) e, durante l'intera attività, l'apparato sperimentale è stato sottoposto a rigorosi controlli di qualità.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I valori di concentrazione relativi a ciascun elemento, espressi come g/kg di peso fresco, sono stati calcolati effettuando una operazione di media sui valori di tre letture ripetute ed ogni campione è stato preparato ed analizzato in doppio. In Tabella 1 vengono riportati per ciascuna tipologia di latte alcuni parametri analitici di interesse: valore medio ed indice di dispersione, espresso come coefficiente di variazione percentuale. Dall'analisi dei risultati ottenuti, per il latte caprino, si può notare una marcata variabilità intraspecie per tutti gli elementi analizzati ad eccezione dello Zn. Il Co è presente in tenori simili in tutti i campioni tranne limitate eccezioni che determinano un alto valore del coefficiente di variazione, mentre il Cr risulta l'elemento con concentrazione minima. Dal confronto con i dati riportati in letteratura<sup>1,2</sup>, si evince che il contenuto medio di Fe e Zn è paragonabile, mentre Cu, Mn e Se risultano inferiori. Per quanto riguarda il latte ovino, lo Zn il Pb ed il Cd presentano valori di dispersione contenuti, mentre l'As è l'elemento a concentrazione minima. In tutti i campioni gli elementi tossici sono presenti in concentrazioni tali da non destare preoccupazioni di carattere sanitario, mentre il confronto tra le due specie in esame, pur nei limiti di ridotte statistiche, ha messo in risalto un differente comportamento ed una maggiore concentrazione media ( $p < 0,5$ ) di Zn, Fe, Mo, Mn e Pb nel latte ovino rispetto a quello caprino, confermando ulteriormente l'esistenza di una differenza di specie. In conclusione i differenti livelli di elementi in traccia sono attribuibili a numerosi fattori quali la biodisponibilità, l'assorbimento, la mobilità, l'accumulo e l'escrezione di ciascun elemento e, all'interno della stessa specie, all'inquinamento ambientale ed a fattori genetici<sup>3</sup>.

## ■ Determination of trace elements in sheep and goat milk samples

**Key words:** trace elements, milk, sheep, goat.

## Bibliografia

1. Park Y.W. (2007), Small Ruminant Research; 68: 88-113.
2. Garcia M.I.H. (2006), International Dairy Journal; 16: 182-185.
3. Field A.C. (1984) in International Minerals & Chemical Corporation, Mundelein, IL, 71-85.

**Tabella 1** - Tenori di concentrazione media di elementi in traccia e relativi indici di dispersione per le due tipologie di campioni.

Latte caprino	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Se	Zn	As	Cd	Cr	Pb	Latte ovino	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Se	Zn	As	Cd	Cr	Pb
Media	10	87	699	33	19	1,8	4100	0,7	3,1	0,2	8,8	Media	13	113	1240	82	49	21,0	5420	0,5	3,2	0,6	10,4
CV%	64	51	44	38	71	115	19	307	50	102	56	CV%	71	78	51	52	60	119	23	150	40	348	37

# Immunità cellulo-mediata e utilizzo di lino estruso nella dieta di ovini da latte



G. CURINA<sup>1</sup>, B. PATERNESI<sup>1</sup>, M. CAGIOLA<sup>1</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>2</sup>, L. MOSCATI<sup>1</sup>, O. OLIVIERI<sup>2</sup>, G. ACUTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

<sup>2</sup>Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** immunità cellulo-mediata, popolazioni linfocitarie, lino estruso, ovini da latte.

**INTRODUZIONE** - L'utilizzo di diete arricchite con acidi grassi polinsaturi ha suscitato notevole interesse a riguardo della loro interazione con la risposta immunitaria, benché non sia ancora chiaro la loro modalità di azione (Thanasak et al, 2005). Una serie di studi sono stati pubblicati a riguardo della specie bovina (Calder et al., 2001; Caroprese et al., 2009; Caroprese et al., 2006), mentre le conoscenze nell'ovino sono limitate e talvolta discordanti. Lo scopo di questa sperimentazione è stato quello di verificare gli effetti delle integrazioni alimentari a base di lino estruso sull'assetto immunitario di pecore da latte durante le ultime fasi della gestazione, in particolare nei confronti dei linfociti e delle sotto-popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+.

**MATERIALI E METODI - Animali.** Per la prova sono state impiegate 52 pecore di razza sarda suddivise in 2 gruppi omogenei (controllo, CTR e trattato, LIN). Ciascun gruppo era costituito da pecore nell'ultima fase di gestazione e da pecore in asciutta non gravide. Tutti gli animali sono stati alimentati con fieno di erba medica; il gruppo LIN riceveva un mangime, isoenergetico ed isoproteico rispetto a quello somministrato al gruppo CTR ma integrato con semi integrali di lino estruso quale fonte di omega-3.

**Campioni di sangue.** Per la determinazione dei linfociti totali e delle sottopopolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+ (in % e come grado di attivazione), è stato effettuato un prelievo venoso per via giugulare tramite provetta eparinizzata al tempo zero (60 giorni prima del parto) nonché per ulteriori 3 prelievi (a 21 e 14 giorni dal parto e nel pre-parto). È stato effettuato un ulteriore prelievo 90 giorni dopo il parto. Le popolazioni linfocitarie sono state ottenute mediante centrifugazione dei campioni di sangue eparinizzato con gradiente Ficoll-Hystopaque 1077 (Sigma Aldrich).

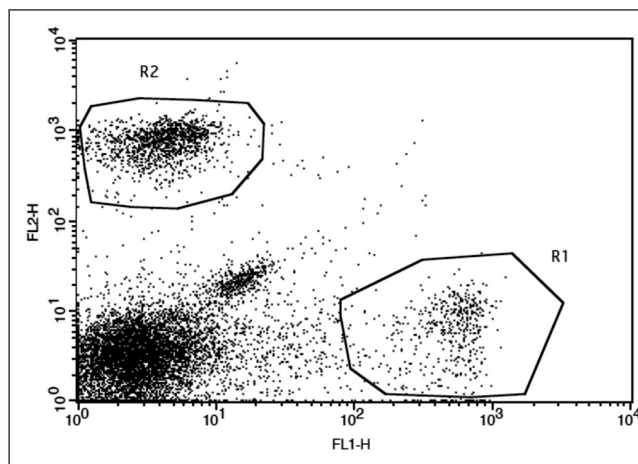
**Preparazione campioni per analisi citofluorimetrica.** Le diverse popolazioni cellulari ottenute da ogni campione di sangue sono state poste ad incubare a 4°C alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule con anticorpi monoclonali primari FITC anti-sheep CD8 (AbD Serotec) e RPE anti-sheep CD4 (AbD Serotec).

**Analisi in citometria a flusso.** I campioni allestiti sono stati processati mediante FACSCalibur (BD Biosciences), equipaggiato con un laser BLUE 488 nm (Alphas). Il settaggio dello strumento è stato ottimizzato utilizzando le CALIBRITErmTM 3 (BD Biosciences). I dati fluorimetrici sono stati analizzati utilizzando il software CellQuest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

**Analisi statistica.** I dati sono stati analizzati mediante procedura GLM del software SAS (2001) utilizzando un modello di analisi della varianza per misurazioni ripetute.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I risultati ottenuti dallo studio delle cellule mononucleate del sangue periferico, sono stati rappresentati come dot plot (Fig. 1). Nello specifico nel gate R1 sono state rappresentate le popolazioni cellulari CD8(+) mentre nel gate R2 sono state raffigurate le popolazioni cellulari CD4(+). L'analisi fenotipica della popolazione linfocitaria ha evidenziato che la risposta immunitaria cellulare è stata influenzata soltanto dallo stato fisiologico degli animali (aumento del grado di attivazione dei CD8+ a 90 giorni dal parto,  $P=0.04$ ). È stato inoltre evidenziato un tendenziale aumento dei linfociti totali e delle sottopopolazioni CD4+ e CD8+ nel corso della prova con un riavvicinamento ai valori basali dopo 90 giorni dal parto (dati non riportati).

Per quanto riguarda il trattamento alimentare (Tab. 1), nel corso della sperimentazione non sono state evidenziate differenze significative a riguardo della risposta immunitaria.



**Figura 1** - Analisi fenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie R2 = CD4 + R1 = CD8+.

**Tabella 1** - Andamento di CD4+ e CD8+ (espressi in % e come grado di attivazione) in dipendenza dal tempo e dal trattamento alimentare (medie stimate±ES).

	Dieta	60 gg prima del parto	21 gg prima del parto	14 gg prima del parto	pre-parto	90 gg dopo il parto	ES
% linfociti	Lino	17.61	20.46	22.90	22.31	16.62	3.60
	controllo	19.38	23.78	23.87	21.53	16.43	
% CD8+	Lino	6.79	7.29	8.99	9.98	5.50	1.00
	controllo	9.49	10.38	10.88	10.38	6.69	
Mean	Lino	488.02	255.59	338.75	473.97	325.07	21.87
	controllo	615.42	282.46	332.54	502.16	312.97	
% CD4+	Lino	10.48	13.16	13.80	12.37	10.98	1.10
	controllo	7.99	13.36	12.86	11.18	9.59	
Mean	Lino	495.3	491.97	647.23	894.31	693.19	27.61
	controllo	612.9	499.19	610.30	898.90	717.63	

*Sperimentazione effettuata nell'ambito del Progetto di Ricerca "Effetti dello stato fisiologico e di una dieta ricca di acidi grassi polinsaturi (PUFA) sulla funzione immunitaria degli ovini" (IZS UM 11/08 RC, Responsabili Dott.ssa L. Moscati).*

## ■ Cell-mediated immune response and use of extruded linseed in the diet of dairy sheep

**Key words:** cell-mediated immunity, lymphocyte populations, extruded linseed, dairy sheep.

## Bibliografia

- Thanasak et al. (2005). Vet. Immunol. Immunopathol. 104, 289-95.  
 Calder P.C. (2001). Nutr. Res., 21, 309-41.  
 Caroprese et al. (2009). J. Dairy Sci. 92, 2796-803.  
 Caroprese et al. (2006). J. Dairy Sci. 89:562-8.  
 SAS Institute Inc. (2001), version 8.2.SAS Institute Inc.



# Episodio abortivo attribuibile a *Y. pseudotuberculosis* in un allevamento ovino dell'Italia centrale



N. D'AVINO<sup>1</sup>, L. ERMINI<sup>2</sup>, G. FILIPPINI<sup>1</sup>, C.F. MAGISTRALI<sup>1</sup>, E. MANUALI<sup>1</sup>, P. PAPA<sup>1</sup>, P. MANGILI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Area Diagnostica integrata, istituto Zooprofilattico Umbria e Marche, Perugia

<sup>2</sup> Medico veterinario Intervet Italia S.r.l.

**Parole chiave:** aborto, pecora, *Yersinia pseudotuberculosis*.

**INTRODUZIONE** - *Yersinia pseudotuberculosis* è un microrganismo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, genere *Yersinia*. È un germe Gram-, bastoncellare o coccobastoncellare, mobile a 22-28°C per la presenza di flagelli peritrichi, anaerobio facoltativo, psicrotrofo<sup>1</sup>. La classificazione comprende sei sierogruppi (da I a VI) suddivisi in sottogruppi (da A ad O) in base agli antigeni somatici, e cinque sottogruppi in base agli antigeni flagellari H (da a ad e)<sup>2</sup>. Quasi tutte le specie animali domestiche e selvatiche sono recettive all'infezione fungendo da *reservoir* (specialmente i roditori), ed in molte di esse *Y. pseudotuberculosis* può causare malattia, compreso l'uomo. L'infezione si trasmette principalmente per via oro-fecale attraverso l'assunzione di acqua e/o cibo contaminati da feci di animali portatori. Generalmente le infezioni sono sostenute da ceppi del sottogruppo O - sierogruppo I<sup>2</sup>. La yersiniosi è essenzialmente una malattia di tipo enterico caratterizzata da quadri differenti a seconda delle specie coinvolte: enterocolite fibrino-emorragica nei piccoli ruminanti, colitoflite difteroidi ed ulcerativa nei suini svezzati, ileite piogranulomatosa e linfadenite caseosa mesenterica nei leporidi. Per via linfo-ematogena l'infezione può diffondere al fegato, milza, polmone e rene con lesioni nodulari a carattere necrotico-purulento<sup>8</sup>. Casi di placentite con aborto sono sporadicamente descritti nella specie bovina ed ovina<sup>15</sup>, ed anche in Italia è stato recentemente segnalato l'isolamento da feto di pecora abortiti<sup>8</sup>. Il presente lavoro descrive un episodio di aborto attribuibile a *Y. pseudotuberculosis* verificatosi in un gregge ovino dell'Italia centrale.

**MATERIALI E METODI** - Nel mese di gennaio 2009 due feto di circa 100-120 giorni, provenienti da un allevamento ovino dell'Italia centrale, sono stati recapitati presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche per accertamenti diagnostici. L'anamnesi riferiva di episodi abortivi che interessavano circa il 10-15% degli animali gravidi nell'ultimo periodo di gestazione. La consistenza del gregge era di circa 1000 capi di razza sarda con rimonta interna. Nell'azienda venivano regolarmente effettuati trattamenti antiparassitari e tutti i capi sono sottoposti a profilassi immunizzante nei confronti di *Chlamydia abortus*, *Salmonella abortus-ovis*, Enterotossiemie e mastite gangrenosa.

In sede necroscopica dai due feto abortiti sono stati prelevati campioni per la ricerca dei principali agenti abortigeni. Sono state eseguite le seguenti analisi: esame batteriologico da fegato, contenuto del IV stomaco e cervello<sup>10</sup>, PCR per *Brucella spp.* dal contenuto del IV stomaco<sup>11</sup>, PCR per *Chlamydia abortus* da polmone<sup>12</sup>, PCR per *Border disease virus* da campione di milza, PCR per *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* da cervello<sup>13</sup>, ricerca di *Listeria spp.* da cervello tramite esame colturale<sup>10</sup>, PCR per *Leptospira spp.* da rene<sup>14</sup>, esame colturale per *Campylobacter fetus* da fegato e contenuto IV stomaco<sup>10</sup>. Le colonie isolate sono state successivamente sottoposte a caratterizzazione morfologica e biochimica.

Gli esami istologici sono stati eseguiti su campioni di tessuto (cuore, polmone, fegato, cervello e rene) fissati in formalina al 10% e colorati con ematossilina-eosina.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - In entrambi i feto le lesioni anatomico-patologiche erano caratterizzate da edema sottocutaneo generalizzato, versamenti cavitari siero-emorragici e diffusa congestione degli organi interni. Gli esami istologici hanno evidenziato l'assenza di lesioni in tutti gli organi ad eccezione dei polmoni, in cui erano presenti focolai di

polmonite ascessuale necrotizzante multifocale, con al centro emboli batterici. Tutti gli accertamenti diagnostici effettuati tramite PCR hanno dato esito negativo. Esito negativo hanno dato pure le indagini batteriologiche volte alla ricerca di *Campylobacter fetus* e *Listeria spp.*

Tutte le matrici sottoposte ad esame batteriologico, eccezion fatta per uno dei due tamponi effettuati sul cervello, hanno invece dato luogo alla crescita su agar sangue di colonie grigie, non emolitiche, in patina e, su agar MacConkey, a colonie lattosio-. I microrganismi in oggetto sono stati successivamente identificati come germi cocco-bastoncellari Gram-, catalasi+, ossidasi- e, seminati su terreno CIN (Cefsulodina, Ir-gasan, Novobiocina) selettivo per *Yersinia spp.*, hanno dato luogo alla crescita di colonie dall'aspetto tipico ad "occhio di bue"<sup>9</sup>. L'allestimento di un kit biochimico (API RAPID 32E Biomerieux, France) ha definitivamente confermato l'isolamento di *Yersinia pseudotuberculosis*, con una percentuale di corretta identificazione pari al 92.2%. I risultati delle indagini batteriologiche, suffragati dagli esiti degli esami istologici, hanno permesso il conseguimento della diagnosi eziologica. Tuttavia l'epidemiologia della yersiniosi unitamente alle modalità di conduzione tipiche dell'allevamento ovino rendono estremamente difficile applicare strategie volte al contenimento ed alla prevenzione della malattia stessa<sup>4</sup>. Sebbene il numero degli episodi di aborto negli ovini attribuibile a *Yersinia pseudotuberculosis* sia probabilmente sottostimato<sup>4</sup>, tale agente non viene generalmente ascritto tra le principali cause di aborto nella specie ovina in Italia.

## ■ An outbreak of ovine abortion caused by *Y. pseudotuberculosis* in a herd in the centre of Italy

**Key words:** abortion, sheep, *Yersinia pseudotuberculosis*.

## Bibliografia

1. Farina R., Scatozza F. "Trattato di malattie infettive degli animali", UTET (Torino, 1995).
2. Noel R. Krieg, John J. Holt, "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I", 1984, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Scott T. Witte, D.P. Sponenberg, T.C. Collins. 1985. JAVMA, Vol 187, No. 8, October 15, 834.
4. A.Otter, 1996, The Veterinary Record, February 10, Letters.
5. MacLeod N.S.M. and others 1992. The Veterinary Record, Juli 25.
6. www.rivistadiagnosica.org, n. 59 1 maggio 2008 "Primo caso di *Yersinia pseudotuberculosis* in provincia di Firenze".
7. Plagemann O. J. 1989, Vet. Med. B 36, 509-514.
8. Liciardi M., et al. (2006) Atti del VIII Congresso nazionale SIDILV, 133-134.
9. Noel R. Krieg, John J. Holt, "Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I", 1984, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
10. Quinn P.J. Carter G.R. (1994) Clinical Veterinary Microbiology, Mosby ed.
11. Romero C., Lopez-Goni I., (1999) Applied and Environmental Microbiology 65(8), 3735-3737.
12. Vicari, N., et al. (2004). Proceedings, 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research (Ed.: Judith Deak), Budapest, Hungary, 1-4 September 2004, p. 297.
13. Magnino S., et al. (2000) La Selezione Veterinaria, Suppl; S15-S23.
14. Merien F., et al. (1992) J. Clin. Microbiol. 30, 2219-2224.
15. Barigazzi G., et al. Clinica Veterinaria 104:293-297, 1981.

# Variazioni quali-quantitative del latte di capra in relazione allo stadio di lattazione



A. DAL PRA', G. RAGONA, A. LOMBARDO, A. PIAZZA, I. PALADINI, I. TELLINI, F. TACCORI, R. CAVALLINA, S. AMATISTE, G. GIANGOLINI, F. CORRIAS, G. BRAJON

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana - Via Appia Nuova, 1411 - 00178 Roma

**Parole chiave:** capra, latte, allevamento biologico.ù

**INTRODUZIONE** - L'allevamento della capra in Toscana è orientato alla valorizzazione di prodotti di nicchia locali: tra questi i formaggi a latte crudo che rappresentano uno sbocco interessante nei mercati a cosiddetta filiera corta. Per garantire e migliorare la qualità dei formaggi sono tuttavia necessari interventi volti ad una razionalizzazione del management aziendale con particolare riguardo alle tecniche di allevamento ed all'igiene delle produzioni. Obiettivo del presente lavoro è quello di studiare le variazioni della qualità del latte di capra prodotto in un'azienda biologica in funzione del periodo di lattazione e delle caratteristiche igienico-sanitarie dell'allevamento.

**MATERIALI E METODI** - L'azienda, ubicata in provincia di Firenze, è ufficialmente indenne da Brucellosi e CAEV free; da anni sono utilizzati rimedi omeopatici per il controllo delle parassitosi intestinali e non si ricorre a vaccinazioni. Sono allevate in maniera semi-estensiva circa 70 capre di razza Camosciata iscritte al Libro Genealogico. L'alimentazione basata prevalentemente su pascolo naturale, viene integrata, al momento della mungitura (2 volte/die), con mangime biologico pellettato commerciale (mais, favino, avena e orzo) e al ricovero, *ad libitum*, con fieno di erba medica di produzione aziendale. Sono state selezionate 10 capre primipare, clinicamente sane, omogenee per età, sviluppo corporeo, stadio di lattazione e tipo di parto (singolo). Da febbraio a settembre sono stati prelevati complessivamente 80 campioni di latte individuale e 80 campioni di latte di capezzolo, alla mungitura del mattino, ad inizio lattazione, a 3 settimane, a 12 settimane ed a fine lattazione. In concomitanza con il prelievo dei campioni è stata misurata la produzione di ciascuna capra e successivamente sui campioni di latte sono state effettuate le seguenti determinazioni analitiche:

- campioni individuale: grasso, proteine, lattosio, residuo secco magro e cellule somatiche (*Combifoss*® - Foss Italia), pH, lattodinamografia (*Formagraph*® - Foss Italia);
- campioni di capezzolo: ricerca di agenti mastidogeni secondo le procedure in uso in laboratorio e cellule somatiche (*Combifoss*® - Foss Italia).

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza, impiegando la procedura GLM del pacchetto statistico SAS® (2003) considerando come effetto fisso la data del prelievo<sup>3</sup>.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La produzione di latte ha oscillato in media da un massimo pari a 1,425 litri in occasione del prelievo a tre settimane ad un minimo pari a 0,955 litri a 7 mesi dall'inizio della lattazione: i dati sono comparabili con i valori medi riportati in letteratura<sup>2</sup>. Nel corso della lattazione non sono stati evidenziati sintomi clinici di mastite sebbene una capra sia risultata eliminatrice persistente dalla emi-mammella destra di *Staphylococcus aureus*. Le cellule somatiche dei campioni individuali hanno variato in media da 491.000 cell/ml a 1.039.000 cell/ml. Le differenze non sono significative e tuttavia indicano uno stato sanitario delle mammelle soddisfacente se si prende come valore soglia discriminante per mammelle sane 750.000 cell/ml<sup>1</sup>. Grasso e residuo secco magro, sono diminuiti significativamente dal primo al terzo prelievo per risalire alla fine della lattazione mentre il lattosio è diminuito progressivamente dall'inizio alla fine della lattazione. Il tempo di coagulazione (r) e la velocità di formazione del coagulo (K<sub>20</sub>) sono diminuiti fino al terzo prelievo evidenziando un miglioramento nei tempi di presa e formazione del coagulo e la consistenza del coagulo (A30) è aumentata progressivamente dall'inizio alla fine della lattazione.

Le variazioni quali-quantitative registrate sono confrontabili con quan-

Variazione quali quantitativa del latte in relazione allo stadio di lattazione.

Parametri	Settimana di lattazione			
	1 sett	3 sett	12 sett	30 sett
Latte prodotto	1.375 a	1.425 a	1.200 a	0.955 b
Cell som (x1000/ml)	491	1039	856	585
Cell som Dx	721	767	829	460
Cell. Som Sx	491	401	1012	698
Grasso (%)	2.97 a	2.90 a	2.47 b	2.97 a
Proteine (%)	3.16	3.18	3.12	3.31
R.S.M.(%)	8.32 a	8.34 a	7.98 b	8.15 ab
Lattosio (%)	4.40 a	4.35 a	4.11 b	4.08 b
pH	5.82	5.91	5.99	5.79
Indice Criosc. (°C)	.5396	.5435	.5366	.5410
r (min)	15.18 a	13.14 a	6.24 b	18.04 a
K <sub>20</sub> (min)	5.60 a	5.42 a	2.17 b	2.15 b
A 30 (mm)	20.35 a	21.16 a	34.51b	41.07 c

a, b = p < 0.05

to riportato da altri autori<sup>2</sup>, in particolare la produzione è risultata in media elevata trattandosi di capre primipare e la qualità chimico fisica migliora dall'inizio della lattazione fino al quarto mese, mentre a fine lattazione peggiora in maniera significativa compromettendo l'attitudine alla caseificazione. I valori delle cellule somatiche hanno indicato uno stato sanitario delle mammelle soddisfacente sebbene l'isolamento persistente di *Staphylococcus aureus* da una emi-mammella, senza aver causato mastite clinica, comporti l'adozione di misure adeguate per garantire la sicurezza dei formaggi derivati, fra queste, trattandosi di un allevamento biologico, la riforma delle capre eliminatrici persistenti. Lo studio ha dunque evidenziato, nella realtà produttiva considerata, la migliore utilizzazione del latte prodotto per la trasformazione in formaggi fino al quarto mese dall'inizio della lattazione, nei rimanenti tre mesi l'attitudine alla caseificazione peggiora suggerendo, fra le scelte aziendali, quella di anticipare la messa in asciutta delle capre salvaguardando così pure il benessere animale.

## ■ Milk quality variation in a goat dairy farm related to lactation period

**Key words:** goat, milk quality.

## Bibliografia

1. Brajon G., Casini M., Perfetti M.G., Mari M. "Citobacteriological control in milk from dairy goats raised on farms with organic breeding". IX Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. 31 de Mayo, 1 y 2 Junio de 2001 Leçn (España).
2. Brown-Crowder, I.E., Hart, S.P., Cameron, M., Sahl, T., Goetsch, A.L. (2001). "Effects of dietary tallow level on performance of Alpine does in early lactation". Small Rumin. Res. 39 (2001) 233-241.
3. SAS, 2003. User's Guide Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

# Il sistema orexinico e il recettore CB1 nella ghiandola mandibolare di pecora



C. DALL'AGLIO<sup>1</sup>, L. PASCUCCHI<sup>1</sup>, F. MERCATI<sup>1</sup>, C. BOITI<sup>2</sup>, P. CECCARELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Anatomia Veterinaria

<sup>2</sup> Sezione di Fisiologia Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Facoltà di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** orexine, CB1, ghiandola mandibolare, pecora.

**INTRODUZIONE** - Il sistema orexinico è un complesso sistema costituito da due neuropeptidi, orexina A e orexina B, e da due recettori, OX1R e OX2R. È stato identificato per la prima volta nel cervello del ratto (De Lecea L et al., 1998), e, successivamente, nel sistema nervoso periferico e in organi periferici dell'uomo (Nakabayashi M et al (2003), di animali da laboratorio (Johren O et al (2001) e di animali domestici (Dall'Aglio C et al., 2008; 2010). In bibliografia non sono presenti dati riferibili alla sua distribuzione nelle ghiandole salivari, pertanto uno degli scopi di questo lavoro è stato quello di analizzare la sua presenza nella ghiandola mandibolare della pecora, mediante metodiche immunostochimiche. Sempre sulle stesse ghiandole è stata indagata la presenza del recettore CB1 per gli endocannabinoidi. Questo recettore è stato già evidenziato nel sistema dei dotti delle ghiandole salivari maggiori del ratto e del cane, e la sua presenza è stata giustificata con l'ipotesi che sostanze endogene, identificabili con gli endocannabinoidi, possano intervenire a livello dei dotti ghiandolari favorendo modificazioni qualitative e quantitative della saliva primaria.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata eseguita su campioni di ghiandola mandibolare provenienti da pecore adulte, regolarmente macellate presso il mattatoio di Ponte san Giovanni, Perugia. Il materiale prelevato è stato immediatamente fissato per immersione in formalina tamponata al 4% in PBS per 24 ore a temperatura ambiente e quindi disidratato e incluso in paraffina. Sezioni seriali di 5µm di spessore sono state raccolte su vetrini trattati con polilissina; quindi sono state sottoposte all'indagine immunostochimica per l'evidenziazione dei due peptidi OXA e OXB e dei due recettori OX1R e OX2R, per quanto riguarda il sistema orexinico, e del recettore CB1. La reazione immunostochimica è stata preceduta da uno smascheramento antigenico con forno a microonde utilizzando tampone citrato 0.01 M a pH 6.0 (sono stati fatti tre cicli della durata di cinque minuti ciascuno). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: due anticorpi monoclonali anti-orexina A e anti-orexina B (MAB763 e MAB734, R&D Systems), un anticorpo policlonale anti-recettore di tipo 1 (O 4514, Sigma), un anticorpo policlonale anti-recettore di tipo 2 (AB3094, Chemicon) e un anticorpo policlonale anti-CB1 (sc-17555, Santa Cruz Biotechnology), in idonea concentrazione. Il legame antigene-anticorpo è stato dimostrato mediante la tecnica dell'avidina-biotina e la reazione è stata sviluppata con l'uso della diaminobenzidina, secondo le indicazioni del produttore.

Controlli positivi e negativi sono stati inseriti nella ricerca.

**RISULTATI** - Lo studio immunostochimico condotto per il sistema orexinico ha consentito di evidenziare una forte positività citoplasmatica per i due peptidi OXA e OXB nelle cellule dei dotti striati della ghiandola mandibolare, in tutti gli animali studiati. Inoltre nella stessa ghiandola, il recettore di tipo 1 è stato osservato nel citoplasma di alcune cellule dei dotti striati e nel citoplasma delle cellule sierose. In particolare, le cellule dei dotti positive all'OX1R hanno presentato una morfologia sovrapponibile a quella delle cellule endocrine, con il nucleo in posizione basale e la parte apicale del citoplasma stretta e allungata. Sono risultate completamente negative le cellule mucose delle strutture acinose. L'anticorpo per il recettore di tipo 2 non ha dato positività in alcuna struttura ghiandolare.

Lo studio immunostochimico condotto per il recettore CB1 ha consentito di evidenziare una forte positività per questo nel citoplasma delle cellule dei dotti striati nella ghiandola mandibolare, in tutti gli animali studiati. La positività è apparsa esclusivamente localizzata in pros-

simità della membrana apicale delle cellule dei dotti, mentre la restante porzione citoplasmatica delle stesse cellule è risultata completamente negativa, come negative sono risultate anche le strutture acinose.

**CONSIDERAZIONI** - Il presente studio evidenzia per la prima volta la presenza del sistema orexinico nella ghiandola mandibolare e conferma la presenza del recettore CB1 nella stessa ghiandola della pecora, come peraltro già dimostrato nel ratto (Prestifilippo JP et al., 2006) e nel cane (Dall'Aglio C et al., 2008), limitatamente al CB1. La positività immunostochimica evidenziata per i componenti del sistema orexinico interessa tutto il citoplasma cellulare mentre per il CB1 l'immunopositività è localizzata sulla membrana cellulare apicale o in prossimità della stessa: ciò rispecchia fedelmente le caratteristiche di questo recettore che appartiene alla super-famiglia dei recettori di membrana collegati alla proteina G. Per il CB1 non è stata osservata positività nelle cellule degli acini e, anche questo dato corrisponde ai risultati immunostochimici riferiti al ratto (Prestifilippo JP et al., 2006) e al cane (Dall'Aglio C et al., 2008).

Sulla base di queste considerazioni, la presenza del sistema orexinico e del recettore CB1 nella ghiandola mandibolare della pecora ci consente di ipotizzare che, anche in questo animale, il controllo della secrezione salivare possa essere in parte ascrivito all'intervento di sostanze endogene, quali le orexine e gli "endocannabinoidi". Questi intervengono verosimilmente modificando le caratteristiche qualitative e quantitative della saliva agendo in parte, per quanto riguarda le orexine, a livello delle cellule sierose degli acini, e in parte a livello dei dotti striati dove peraltro c'è anche una produzione endogena delle orexine. Non ci sorprende la coesistenza dei due sistemi a livello delle cellule dei dotti striati dato che questo dato è stato già evidenziato nei neuroni del sistema nervoso centrale (Cota et al., 2003) e sottolinea ancora di più la compartecipazione dei due sistemi nel controllo della secrezione salivare.

## ■ The orexinic system and the receptor CB1 in the mandibular gland of sheep

**Key words:** orexins, CB1, mandibular gland, sheep.

## Bibliografia

- De Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X.B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L.F., Gautvik V.T., Barlett II F.S., Frankel W.N., Van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 322-327.
- Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T., Sasano H. (2003) *Mol Cell Endocrinol* 205: 43-50.
- Johren O., Neidert S.J., Kummer M., Dendorfer A., Dominiak P. (2001) *Endocrinology* 142: 3324-3331.
- Dall'Aglio C., Pascucci L., Mercati F., Giontella A., Pedini V., Scocco P., Ceccarelli P. (2008) *Eur J Histochem* 52(4): 229-236.
- Dall'Aglio C., Pedini V., Scocco P., Boiti C., Ceccarelli P. (2010) *Res Vet Sci* DOI:10.1016/j.rvsc.2010.03.003.
- Prestifilippo J.P., Fernández-Solari J., De La Cal C., Iribarne M., M. Suburo A., Rettori V., McCann S.M., Elverdin J.C. (2006) *Exp Biol Med* 231: 1421-1429.
- Cota D., Morsicano G., Tschöp M., Grübler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thöne-Reineke C., Ortmann S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E., Linthorst A.C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G.K., Fagotto U. (2003) *J Clin Invest* 112(3): 423-431.

# Effetto del genotipo al locus della $\alpha$ s1-caseina e della dieta sulle proprietà di coagulazione del latte di capre di razza derivata di Siria



A. DI TRANA<sup>1</sup>, P. DI GREGORIO<sup>1</sup>, M. PIZZILLO<sup>2</sup>, G. MAGGIO<sup>1</sup>,  
V. PACE<sup>2</sup>, M.A. DI NAPOLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Basilicata  
Viale dell'Ateneo Lucano, 10 - 85100 Potenza, Italia

<sup>2</sup> CRA - ZOE Unità di Ricerca per la Zootecnia Estensiva, Bella Scalo - 85054 - Muro Lucano (PZ), Italia

**Parole chiave:** Genotipo  $\alpha$ s1-CASEINA, dieta, proprietà di coagulazione del latte.

**INTRODUZIONE** - Il polimorfismo genetico al locus  $\alpha$ s1-caseina (CSN1S1) influenza il contenuto di caseina (Martin et al., 1999) nel latte di capra inoltre, influenza il contenuto di grasso (Grosclaude et al., 1994), di urea (Avondo et al. 2009) e i parametri di coagulazione del latte (Clark & Sherbon, 2000; Zullo et al., 2005). Anche la nutrizione dell'animale produce variazioni nella composizione del latte (Schmidely et al. 2002) e nella sua attitudine alla coagulazione (Malossini et al., 1996). La relazione tra la nutrizione e il genotipo al locus CSN1S1 sulle caratteristiche del latte di capra è stata affrontata, solo di recente, in animali alimentati *ad libitum* con crescente apporto di fieno (Pagano et al., 2010), con diverso tenore proteico (De la Torre et al., 2009) e al pascolo (Bonanno et al., 2007). Sulla base di quanto premesso, è stato eseguito uno studio finalizzato a valutare l'effetto del genotipo al locus CSN1S1 e della dieta, a diversa copertura dei fabbisogni nutritivi, sulle proprietà di coagulazione del latte di capre di razza Derivata di Siria.

**MATERIALE E METODI** - La ricerca è stata condotta su 18 capre di razza Derivata di Siria omogenee per produzione di latte (1,3±0,3kg), giorni di lattazione (50±3) e peso corporeo (42,1±1,2kg) selezionate in base al loro genotipo al locus CSN1S1: 9 capre omozigoti per l'allele forte A (AA) e 9 capre omozigoti per l'allele debole F (FF). Tutte le capre sono omogenee per i geni per la CSN1S2, CSN2. Il DNA delle capre è stato ottenuto da bulbi piliferi secondo quanto riportato in Pagano et al., (2010). Il genotipo degli animali è stato determinato secondo Ramunno et al. (2000). È stato utilizzato un modello sperimentale fattoriale 2 x 3 con due genotipi (AA e FF) e tre diete (D) che coprivano il 70, 100 e *ad libitum* del fabbisogno energetico e il 75, 105 e *ad libitum* del fabbisogno proteico. Le tre diete sono state indicate con L, M e H. Gli animali sono stati mantenuti in box singoli. La prova, relativa alla singola dieta testata, ha avuto la durata di 8 giorni preceduta da 15 giorni di adattamento. I campioni di latte sono stati prelevati per due giorni nel corso del periodo sperimentale. Sul latte sono stati determinati il pH e i seguenti parametri lattodinamografici: tempo di coagulazione (r), velocità di formazione del coagulo (k20), consistenza del coagulo (a30) mediante Formagraph (MASTRES, FOSS, Italia). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con la procedura ANOVA (Systat 11) prendendo in esame il fattore genotipo alle  $\alpha$ s1-caseina (G), la dieta (D) e la loro interazione (G x D). La differenza tra le medie è stata valutata con il test LSD.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Dai risultati ottenuti è stata messa in luce l'interazione tra il genotipo al locus CSN1S1 e la dieta utilizzata dagli animali. Il genotipo e la dieta hanno influenzato in maniera significativa ( $P<0,05$ ) i parametri r, k20 e a30. Nella Tabella 1 sono riportati i valori medi relativi all'effetto della dieta entro il genotipo. Nel gruppo AA la velocità di formazione del coagulo (k20) è stata significativamente ( $P<0,05$ ) più elevata nei soggetti che hanno utilizzato la dieta H e L rispetto a quelli che hanno utilizzato la dieta M. Per quanto concerne la consistenza del coagulo (a30) è stata rilevata una tendenza ( $P>0,05$ ) verso valori più elevati per i soggetti AA alimentati con la dieta M rispetto a quelli con la dieta H. Il pH e il tempo di coagulazione (r) non hanno manifestato differenze tra le diete. In media il gruppo di capre FF alimentate con la dieta H ha presentato un tempo di coagulazione (r) significativamente più elevato ( $P<0,01$ ) del gruppo alimentato con la dieta L, mentre quello che ha ricevuto la dieta M ha mostrato un valore intermedio e non statisticamente diverso dai primi due. La velocità di formazione del coagulo (k20) è stata maggiore ( $P<0,01$ ) per il gruppo FF con dieta H rispetto alle diete M e L. Non sono state rilevate differenze per il pH e la consistenza del coagulo (a30). I risultati ot-

**Tabella 1** - Effetto del genotipo al locus della  $\alpha$ s1-caseina e della dieta sulle proprietà di coagulazione del latte di capra.

G	D	Parametri			
		pH	r (min)	k20 (min)	a30 (mm)
AA	H	6.66	12.19	1,64 <sup>a</sup>	43,77 <sup>b</sup>
AA	M	6.69	13.02	1,47 <sup>b</sup>	48,19 <sup>a</sup>
AA	L	6.70	12.81	1,63 <sup>a</sup>	44,78 <sup>ab</sup>
	ES	0.02	0.45	0.06	1.42
	P	ns	ns	*	&
FF	H	6.71	14,48 <sup>a</sup>	1,72 <sup>a</sup>	46.47
FF	M	6.71	13,68 <sup>ab</sup>	1,58 <sup>b</sup>	45.89
FF	L	6.68	12,71 <sup>b</sup>	1,53 <sup>b</sup>	46.82
	ES	0.02	0.41	0.05	0.94
	P	ns	**	**	ns

G: genotipo; D: dieta; H: *ad libitum*; M: 100-105% dei fabbisogni; L: 70-75% dei fabbisogni; ES: errore standard della media; livelli di significatività: ns = non significativo; \*  $P<0,05$ ; \*\*  $P<0,01$ ; & =  $P>0,05$ .

tenuti sono da mettere in relazione alla produzione e alla composizione, in termini di proteina e caseina, del latte ottenuto (dati non riportati). Da questa prima indagine è emerso che i parametri indicatori delle proprietà di coagulazione del latte manifestano un comportamento che risente del genotipo animale in funzione della copertura dei fabbisogni, energetici e proteici, realizzata con la dieta. Si potrebbe ipotizzare una gestione dell'alimentazione in funzione del genotipo.

*Ringraziamenti:* ricerca effettuata con finanziamento MIUR, PRIN 2007 prot. 2007B4JBWN\_003.

## ■ Effect of genotype at $\alpha$ s1-casein locus and diet on the coagulation properties of Derivata di Siria goat milk

**Key words:**  $\alpha$ s1-Casein genotype, diet, coagulation properties.

## Bibliografia

- Avondo M., Pagano R.I., Guastella A.M., Criscione A., Di Gloria M., Valenti B., Piccione G. & Pennisi P. 2009. J. Dairy Res. 76: 202-209.
- Bonanno A., Finocchiaro R., Di Grigoli A., Sardina M.T., Tornambè D. & Gigli I. 2007 Proceedings Symposium of the International Goat Association (IGA) The quality of goats products, CRA-Uze, Bella (PZ), Italy, p. 70.
- Clark, S., and Sherbon J.W. 2000 Small Rum. Res. 38: 123-134.
- De la Torre G., Ramos Morales E., Serradilla J.M., Gil Extremera F. & Sanz Sampelayo M.R. 2009. J. Dairy Res. 76: 137-143.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L. & Bouillon J. 1994 INRA Prod. Anim. 7 3-19.
- Malossini F., Bovolenta S., Piras C., Dalla Rosa M., Ventura W. 1996 Ann. Zootech. 45: 29-40.
- Pagano R.I., Pennisi P., Valenti B., M. Lanza, Di Trana A., Di Gregorio P., De Angelis A., Avondo M. 2010. J. Dairy Res. 77: 245-251.
- Ramunno L., Cosenza G., Pappalardo M., Pastore N., Gallo D., Di Gregorio P. & Masina P. 2000 Anim. Gen. 31: 333-346.
- Schmidely Ph., Meschy F., Tessier J. & Sauviant D. 2002 J. Dairy Sci. 85: 2299-2307.
- Zullo A., Barone C.M.A., Chianese L., Colatruogio P., Occidente M., Matasino D. 2005. Small Rum. Res. 58: 223-230.



# Effetti di differenti cotici erbosi sulle caratteristiche del formaggio di *Capra dell'Aspromonte*



F. FOTI, M. SCERRA, L. BUMBACA, P. CAPARRA, C. CILIONE, A. GIORGI, S. POSTORINO<sup>1</sup>, V. SCERRA

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-forestali e Ambientali - Università degli Studi "Mediterranea" di Reggio Calabria

<sup>1</sup> Fondazione Mediterranea Terina - Regione Calabria

**Parole chiave:** capra dell'Aspromonte, pascolo, caratteristiche formaggio.

**INTRODUZIONE** - La presenza dell'allevamento caprino nella fascia ionica della provincia di Reggio Calabria, caratterizzata dalla presenza di aree marginali sul massiccio dell'Aspromonte, è legata alla capacità di questi animali di trasformare risorse foraggere naturali in prodotti di elevata qualità. La possibilità per gli animali di nutrirsi di erbe ed essenze aromatiche presenti nell'ambiente circostante potrebbe rendere l'allevamento al pascolo più adatto all'ottenimento di prodotti di alta qualità, maggiormente richiesti dal consumatore moderno (Fedele et al., 2005). Il formaggio prodotto con latte di capre alimentate al pascolo, realizzato con le tecniche tradizionali dell'Aspromonte rispettose dei microrganismi autoctoni presenti nel latte, garantisce il massimo grado di "tipicità" (Caridi et al., 2003). La ricchezza e la particolarità delle specie vegetali, con cui si alimentano gli animali al pascolo, sono il primo elemento che influisce sulle caratteristiche del formaggio di *capra dell'Aspromonte*. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare gli effetti sulle caratteristiche quanti-qualitative del formaggio di *capra dell'Aspromonte* alimentate con due pascoli a differente composizione botanica, uno costituito da erbaio rappresentato prevalentemente da leguminose e l'altro da pascolo naturale.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta presso un'azienda sita nella fascia ionica collinare aspromontana della provincia di Reggio Calabria. Una superficie di due ettari è stata utilizzata per la semina di un erbaio costituito da un miscuglio di trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum*) (70%) ed avena (*Avena sativa*) (30%) allo scopo di far pascolare le capre. Per la prova sono state utilizzate trenta capre divise in due gruppi: "Gruppo Aziendale (GA)", alimentato con pascolo naturale e "Gruppo Sperimentale (GS)", alimentato con erbaio di trifoglio e avena. Le superfici ad erbaio e a pascolo naturale, di circa due ettari, sono state recintate per effettuare un pascolo turnato; in entrambi gli appezzamenti sono stati eseguiti prelievi di pascolo ed erbaio per valutare la composizione floristica e le caratteristiche chimico-nutrizionali. Sui campioni di alimenti sono state valutate la composizione chimico-nutrizionale e la digeribilità in vitro (Martillotti F. et al., 1987; Goering et al., 1970). Ogni quindici giorni è stata controllata la produzione di latte individuale e si è proceduto alla determinazione dei parametri fisico-chimici secondo la metodica ASPA, 1995. In corrispondenza del prelievo dei campioni di latte effettuati per ogni gruppo è stata effettuata la caseificazione. Le capre dei due gruppi sperimentali non hanno ricevuto alcuna integrazione alimentare. Dopo 24 ore dalla caseificazione e dopo 30 giorni di stagionatura è stata calcolata la resa in formaggio ed, inoltre, sono stati prelevati dei campioni di formaggio per la determinazione delle analisi chimico-fisiche: pH, sostanza secca, proteine, azoto solubile, grasso, ceneri e cloruri (APHA, 1993); sul grasso del formaggio è stata determinata la composizione in acidi grassi mediante gascromatografia (Varian, modello 3400 cx). I dati sono stati elaborati dal programma ANOVA applicando il pacchetto operativo SPSS, che ha fornito i risultati relativi agli effetti del trattamento e gli errori sperimentali.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La composizione acidica delle due essenze foraggere ha evidenziato una differenza statisticamente significativa dell'acido linoleico del gruppo GS rispetto al gruppo GA (10,13% vs 8,61%;  $P < 0,001$ ) mentre l'acido linolenico è risultato statisticamente significativo nel gruppo GA rispetto al gruppo GS (57,30% vs 41,34%;  $P < 0,001$ ). L'effetto dell'assunzione dei differenti cotici erbo-

si ha influenzato le caratteristiche chimico-fisiche del formaggio dopo 24 ore dalla caseificazione. Infatti, tra i due gruppi sperimentali si evince una differenza statisticamente significativa per il grasso (41,39% vs 37,20%;  $P < 0,01$ ), le ceneri (9,68% vs 6,92%;  $P < 0,001$ ) e i cloruri (1,58% vs 0,92%;  $P < 0,001$ ) del gruppo GS rispetto al gruppo GA mentre l'azoto solubile (4,74% vs 3,10%;  $P < 0,001$ ) risulta statisticamente significativo nel gruppo GA. Le analisi effettuate sul formaggio dopo 30 giorni di stagionatura hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa per la sostanza secca (78,28% vs 70,20%;  $P < 0,001$ ) e i cloruri (4,52% vs 2,53%;  $P < 0,01$ ) nel gruppo GS rispetto al gruppo GA. La resa in formaggio del latte caprino di massa non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa nel gruppo GS rispetto al gruppo GA dopo 24 ore dalla caseificazione (13,51% vs 13,26%) mentre si è osservata una differenza statisticamente significativa dopo 30 giorni di stagionatura (9,45% vs 6,90%;  $P < 0,001$ ). La composizione acidica del formaggio caprino dell'Aspromonte, dopo 24 ore dalla caseificazione, ha evidenziato nel gruppo GA differenze statisticamente significative rispetto al gruppo GS di acido stearico (14,95% vs 13,30%;  $P < 0,001$ ), acido oleico (24,15% vs 23,27%;  $P < 0,001$ ), acido linoleico (2,94% vs 2,25%;  $P < 0,001$ ) mentre l'acido linolenico (0,94% vs 0,64%) e CLA (0,82% vs 0,75%) sono tendenzialmente superiori. La composizione acidica del formaggio dopo 30 giorni di stagionatura, ha evidenziato nel gruppo GA differenze statisticamente significative rispetto al gruppo GS di acido stearico (16,01% vs 13,59%;  $P < 0,05$ ) e acido oleico (26,75% vs 25,55%;  $P < 0,01$ ), mentre acido linoleico, l'acido linolenico e CLA non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa. I nostri risultati suggeriscono ulteriori studi per poter correlare la composizione chimica delle diverse famiglie botaniche che costituiscono il pascolo con la composizione chimica dei formaggi.

## ■ Effects of different sward on cheese characteristics from Aspromonte goats

**Key words:** Aspromonte goat, pasture, cheese features.

## Bibliografia

- APHA (1993), In: Marshall R.T. (Ed), Standard Methods for the Examination of Dairy Products. APHA (American Public Health Association) INC. Washington, DC, USA.
- Caridi A., Micari P., Foti F., Ramondino D., Sarullo V. (2003) - Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. Food Microbiology 20: 201-209.
- Fedele V., Pizzillo M., Claps S., Cifuni G.G. (2005°). Effect of types of forage on terpenes content and profile in goat milk. In: 11th Seminar of the Sub-Network FAO-CIHEAM on Sheep and Goat Nutrition, Catania (It.), 8-10 September 2005, p. 14.
- Goering H.K., Van Soest P.J. (1970) - Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agricultural Handbook, No. 379. Agric. Res. Serv., USDA, Washington, DC, 1-20.
- Martillotti F., Antongiovanni M., Rizzi L., Santi E., Bittante G. (1987) - Metodi di analisi per la valutazione degli alimenti d'impiego zootecnico. IPRA, Roma.
- ASPA (Commissione Valutazione Alimenti) (1995) - Valutazione nutrizionale degli alimenti di interesse zootecnico. Analisi chimica. Zoot. Nutr. Anim., 6, pp. 19-34.

# Le strongilosi broncopolmonari dei caprini in Sardegna: aggiornamenti epidemiologici



G. GARIPPA, M. CULMONE, N. GURIA, S. MELE, M.C. PIRAS, G. TILOCCA, P. MERELLA

Dipartimento di Biologia Animale, Sez. Parassitologia e Malattie Parassitarie, Università di Sassari  
Via Vienna, 2 - Sassari

**Parole chiave:** strongili broncopolmonari, caprini, epidemiologia, Sardegna.

**INTRODUZIONE** - Le strongilosi broncopolmonari dei caprini rappresentano uno dei fattori maggiormente limitanti per le produzioni del comparto, in virtù della loro diffusione e patogenicità, nonché per le difficoltà nel loro controllo (profilassi e terapia). In questa nota, vengono riferiti i risultati preliminari di un'indagine epidemiologica finalizzata ad aggiornare i dati sulla diffusione degli strongili broncopolmonari (*Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris*, *Protostrongylus rufescens*, *Cystocaulus ocreatus*, *Neostongylus linearis*) nei caprini adulti della Sardegna.

**MATERIALI E METODI** - Dal gennaio 2008 al dicembre 2009 sono stati esaminati pool fecali provenienti da 93 allevamenti caprini allevati in differenti località della Sardegna. La ricerca e l'isolamento delle larve di primo stadio (L<sub>1</sub>) degli strongili broncopolmonari (SBP) sono stati effettuati secondo la metodica di Baermann; le specie repertate sono state identificate utilizzando le chiavi morfometriche riportate da Euzaby (1982). La prevalenza è stata calcolata in accordo con Bush et al. (1997). **RISULTATI** - SBP sono stati riscontrati nel 64,1% degli allevamenti (60/93). Complessivamente sono state repertate le specie riportate in tabella (Tab. 1), con una netta predominanza di *M. capillaris* rispetto a *C. ocreatus* e a *N. linearis*. Da rilevare il mancato riscontro *D. filaria* e *P. rufescens*.

Maggiormente diffuse (81,7%) sono risultate le infestazioni monospesifiche, presenti in 49 allevamenti e sostenute esclusivamente da *M. capillaris*. Le infestazioni polispecifiche, riscontrate in 11 allevamenti (18,3%), erano caratterizzate dalle associazioni *M. capillaris* e *C. ocreatus* (90,9%) e *M. capillaris* e *N. linearis* (9,1%).

**CONSIDERAZIONI** - I risultati dell'indagine, seppur preliminari, consentono di disporre di un quadro aggiornato sulle strongilosi broncopolmonari dei caprini in Sardegna.

L'indagine ha confermato come gli SBP siano una presenza costante in tutti gli allevamenti caprini della Sardegna. Rispetto alle precedenti indagini viene invece evidenziata una differente composizione della fauna parassitaria dell'apparato respiratorio, caratterizzata in passato dalla presenza di *C. ocreatus* associata ad una bassa positività per *P. rufescens* (Garippa et al., 1992), e dal riscontro *M. capillaris*, sempre accompagnato da una scarsa presenza di *P. rufescens* (Scala et al., 1994, 1996). Differente anche il profilo parassitologico dell'apparato respiratorio dei caprini della Sardegna rispetto a quello dell'Italia continentale. Un'indagine condotta nelle Isole Tremiti su un nucleo di capre inselvatichite ha evidenziato la presenza di tutte le specie di protostrongilidi (Cafiero et al., 1992). Genchi et al. (1984) hanno riscontrato, in caprini conviventi con ovini e camosci della Val Belviso e Val Brandet (Alpi Orobie) una prevalenza per SBP del 64% e caratterizzata dalla presenza di *D. filaria* (33%), *M. capillaris* (44%), *Protostrongylus* spp. (64%), *C. ocreatus* (64%), *N. linearis* (27%). Successivamente, Traldi e Franchi (1987), hanno evidenziato, in caprini allevati in provincia di Varese, una preva-

lenza complessiva pari all'80%, caratterizzata dalla presenza di *D. filaria* (12%), *M. capillaris* (85%), *P. rufescens* (48%), *C. ocreatus* (78%) e *N. linearis* (72%). Nel 1989, Manfredi e Mohamed, su caprini provenienti da zone alpine e prealpine hanno riscontrato le specie: *M. capillaris*, *P. rufescens*, *N. linearis* e *C. ocreatus*.

In assenza di ulteriori indagini condotte sui caprini, ricerche sulla parassitofauna dell'apparato respiratorio di "piccoli ruminanti" o di "ovicaprini", pur non differenziando le specie presenti e le eventuali differenze di prevalenza negli ovini e nei caprini, consentono di rilevare come la parassitosi sia diffusa in tutte le regioni italiane con tassi di prevalenza sempre elevati.

In conclusione si ritiene opportuno sottolineare: la carenza di indagini che consentano di definire i diversi aspetti (eziologia, epidemiologia, ecc.) della strongilosi broncopolmonare dei caprini; come la composizione della fauna parassitaria dei caprini differisca sostanzialmente da quella degli ovini, non solo della Sardegna ma anche del resto dell'Italia. Ne consegue la necessità di condurre ulteriori indagini epidemiologiche indispensabili per impostare piani di controllo efficaci per questa specie.

Il corretto controllo di queste parassitosi, consentendo un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni, potrà rappresentare un'occasione di sviluppo economico-sociale delle aree marginali, collinari e montane. In esse infatti, l'allevamento dei caprini, oltre a consentire il mantenimento delle biodiversità e l'utilizzo rispettoso delle risorse naturali, riveste particolare importanza per lo sviluppo di produzioni di qualità legate al territorio.

Ricerca finanziata da R.A.S. "Intervento P5a A.P.Q. Ricerca: Biodiversità animale, Scheda n. 12".

## ■ Lungworms in goats from Sardinia: epidemiological updates

**Key words:** lungworms, goats, epidemiology, Sardinia.

## Bibliografia

- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W., (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol*, 83: 575-583.
- Cafiero M.A., Fasanella A., Puccini V. (1992) Rilievi parassitologici su un nucleo di ovi-caprini inselvatichiti nelle isole Tremiti (S. Nicola). *Atti SIPAOC* 10: 95-96.
- Garippa G., Delogu M., Sanna M.L. (1991). Endoparassiti dei caprini *Atti SIPAOC*, 10: 93-94.
- Genchi C., Manfredi M.T., Sioli C. (1984) Les infestation naturelles des chèvres par les strongles pulmonaires en milieu alpin. *Les Colloques de l'INRA*, 28: 347, 352.
- Manfredi M., Mohamed M. A. Le elmintiasi broncopolmonari dei ruminanti domestici e selvatici. *Atti SISVet* 1989, 43:1461-1464.
- Scala A., Farina S., De Santis E.P.L. (1996). Parassitosi delle capre da latte in Sardegna: valutazione degli esami copromicroscopico nel periodo peripartale. *Atti SIPAOC* 12: 397-400.
- Scala A., Vacca G.M., Puggioni G., Carcangiu V., Bini P.P., Sulis F. (1998). L'allevamento caprino nell'istituendo parco naturale del Sulcis: situazione igienico-sanitaria. *Atti del Convegno "Biodiversità: Germoplasma Locale e sua valorizzazione"*, 1151-1154.
- Traldi G., Franchi C., (1987) Indagine sulla diffusione delle elmintiasi nell'allevamento ovino e caprino in provincia di Varese. *Sel. Vet.* 28: 1485-1491.

**Tabella 1**

Specie	N. all. positivi	%
<i>Muellerius capillaris</i>	60	100
<i>Cystocaulus ocreatus</i>	10	16,7
<i>Neostongylus linearis</i>	1	1,7

# Superovulazione in pecore di 10 mesi di età con FSH di origine suina e ovina



F.A. HOZBOR<sup>1</sup>, J. MANES<sup>1</sup>, N.C. MUCCI<sup>1</sup>, G. CUESTAS<sup>2</sup>, L. VINCENTI<sup>3</sup>,  
A. RICCI<sup>3</sup>, Y.H.E. SANCHEZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Biotecnología de la Reproducción, EEA INTA Balcarce - fhozbor@balcarce.inta.gov.ar

<sup>2</sup> Servicio Integral de Biotecnologías en Reproducción Animal

<sup>3</sup> Università degli studi di Torino, Dipartimento di Patologia Animale

<sup>4</sup> Sistemas de Producción, EEA INTA Balcarce

**Parole chiave:** superovulazione, FSH, pecora.

**INTRODUZIONE** - Lo scopo di questo studio è quello di confrontare la risposta ovarica e il numero di embrioni trasferibili ottenuti con due trattamenti di superovulazione con FSH di origine ovina (ÖVAG®) (FSHo, Nuova Zelanda bio ICP) e suina (Pluset®, Laboratorios SA Calier Spagna) (FSHp) in pecore Texel.

**MATERIALI E METODI** - Sono state utilizzate 9 pecore Texel di 10 mesi di età con un punteggio di body condition score (BCS) di 3,5 - 4 (scala 1-5) e  $40 \pm 2.3$  kg di peso.

L'Estro è stato sincronizzato in tutte le femmine con l'inserimento di un dispositivo intravaginale in poliuretano impregnato con 60 mg medroxiprogesterone acetato (Progespon®, Syntex SA, Argentina), che è stato rimosso al dopo 8 giorni (giorno 0 = giorno di posizionamento del dispositivo). Il giorno 6, sono stati somministrati 75 mg di prostaglandina contemporaneamente ad una prima iniezione di FSH (cicli DL®, Syntex SA, Argentina). Il trattamento ormonale di superovulazione è iniziato 48 ore prima della rimozione del dispositivo e si è conclusa 12 ore dopo la rimozione dello stesso. Prima dell'inizio del trattamento di superovulazione, gli animali sono stati casualmente assegnati a due gruppi di trattamento.

**FSH suina.** In questo gruppo è stata applicata una dose totale di 400 UI suddivisa in 6 dosi ad un intervallo di dodici ore tra loro (100/100/50/50/50/50 UI).

**FSH ovina.** In questo gruppo la dose totale è stata di 193,6 unità NIH-FSH-S1 suddivisa in 6 dosi con un intervallo di dodici ore tra loro (44/44/26, 26/04, 26/04, 26/04, 4 unità).

Il rilevamento del calore è avvenuto tramite utilizzo di montoni vasectomizzati con un marcatore colorato, 24 ore dopo la rimozione del dispositivo. L'inseminazione artificiale (IA), è stata eseguita a tempo fisso tramite laparoscopia intrauterina, 50 ore dopo la rimozione dei dispositivi con una dose di  $50 \times 10^6$  spermatozoi congelati / scongelati. Sei giorni dopo l'inseminazione artificiale gli embrioni sono stati recuperati tramite laparotomia ventrale media.

Le pecore sono state anesteziate con una iniezione intramuscolare (IM) di 1 ml di xilazina 2% e 3 ml di cloridrato di ketamina. Le ovaie sono state esaminate per determinare la percentuale di pecore che hanno ovulato e il numero totale dei corpi lutei (CL). Sono state considerate con risposta positiva alla superovulazione le pecore con tre o più CL in totale.

Le corna uterine sono state lavate con una soluzione salina tamponata (PBS) integrata con siero fetale bovino e antibiotici all'1% applicata al-

**Tabella 1** - Risposta ovarica e la produzione di embrioni in pecore Texel superovuli con FSH di origine pecora e suina.

Trattamenti	FSH suina	FSH ovina
N° di pecore in calore	4/5 (80%)	2/4 (50%)
N° di Pecore che hanno ovulato	5/5 (100%)	4/4(100%)
N° di Pecora Super Ovulate	5/5 (100%)	5/5 (100%)
N° di Embrioni	$5,6 \pm 1,05$ a	$2,75 \pm 0,83$ b
N° di CL	$11,2 \pm 0,14$	$8,5 \pm 0,17$
Tasso di recupero	36/56 (64,29%)	25/34 (73,53%)

A, b = valori con lettere diverse nella stessa riga differiscono in modo significativo ( $p < 0,05$ ).

l'unione utero-tubarica tramite un catetere. La soluzione di lavaggio e gli embrioni sono stati recuperati utilizzando un catetere di Foley posto alla base del corno uterino. La ricerca è stata effettuata tramite stereomicroscopio a 4x. Gli embrioni sono stati classificati in base alle norme dell'Associazione internazionale di trasferimento di embrioni (IETS 1998). La percentuale di recupero è stata calcolata come il totale di strutture recuperate sul numero di corpi lutei totali presenti.

**ANALISI STATISTICA** - Le percentuali di estro, di ovulazione, di superovulazione e il tasso di recupero sono stati analizzati utilizzando il test esatto di Fisher. Il numero di CL e di embrioni ottenuti è stato analizzato come una distribuzione di Poisson GENMOD utilizzando la procedura del programma statistico SAS.

**RISULTATI** - In risposta ai trattamenti una percentuale elevata di pecore ha manifestato il calore, e il 100% delle pecore ha ovulato (Tabella 1). La risposta alla superovulazione (almeno tre CL per femmina) è risultata indipendente dal trattamento di superovulazione (FSH suina, FSH ovina) utilizzato ( $p > 0,05$ ). Tuttavia, il numero di embrioni differiva significativamente tra i due protocolli (Tabella 1). La variabilità nel numero di CL e il tasso di recupero non sono state influenzate dai trattamenti.

**CONCLUSIONE** - La risposta ovarica è risultata simile in entrambi i trattamenti, ma l'FSH suina ha prodotto un numero maggiore di embrioni.

# Parziale stima dei danni economici provocati dalle mastiti batteriche in allevamenti ovini della Sardegna



G. MAROGNA, C. PILO, G. SCHIANCHI, G.S. LEORI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff"

**Parole chiave:** quota rimonta, latte, scarto.

**INTRODUZIONE** - Le mastiti infettive rappresentano la principale problematica sanitaria che si deve affrontare negli allevamenti di ovini da latte. Gli effetti negativi imputabili alle mastiti sono di natura economica, sanitaria e legale. Nelle pecore le mastiti rappresentano la prima causa di scarto per motivi sanitari. È stato stimato che gli effetti negativi delle mastiti sulla quantità e qualità del latte prodotto siano proporzionalmente superiori rispetto a quelli riscontrati nei bovini, evidenziando anche le influenze negative provocate all'accrescimento degli agnelli e alla caseificazione. In considerazione delle numerose variabili che intervengono, stimare la reale entità del danno economico provocato dalle mastiti è impresa ardua. In questo lavoro sono stati analizzati, in un gruppo di allevamenti problema, la produzione media di latte durante il periodo di piena lattazione e la quota di soggetti riformati per mastite in riferimento alla consistenza dell'allevamento ed alla quota totale di soggetti riformati per cause varie. I dati ottenuti sono stati comparati rispetto ai valori di allevamenti ovini tipo. Questo lavoro è parte, inedita, di una ricerca molto più articolata del CRENMOC già pubblicata, alla quale si rimanda: Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. - Small Ruminant Research - 88 (2010) 119-125.

**MATERIALI E METODI** - Per definire il nostro campione ci si è avvalsi delle banche dati del laboratorio latte dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS) che esegue mensilmente conte delle cellule somatiche sul latte di massa di circa il 90% degli allevamenti isolani. Sono stati selezionati per essere inclusi nella sperimentazione 15 allevamenti problema rispondenti ai seguenti requisiti: (a) un valore di cellule somatiche (SCC), nel latte di massa, sempre superiore ai  $5 \times 10^6$ /ml rilevato in almeno 5 analisi distribuite nell'arco di due anni (2004-2005); (b) più di 50 pecore in allevamento; (c) persistenza del problema sanitario. Tutti i capi visitati e prelevati (2198 pecore) appartenevano alla razza Sarda. Le visite sono state eseguite nel periodo di piena lattazione fra gennaio e aprile 2006. I prelievi di latte e le visite cliniche hanno riguardato l'intero effettivo in lattazione presente in azienda al momento della visita. Sono stati registrati dati generali dell'allevamento: composizione del fondo agricolo, tipo di allevamento, tecnica di mungitura, consistenza del gregge e sue variazioni, quantità di latte prodotto il giorno precedente la visita (2 mungiture) e gli scarti, sia al momento del sopralluogo che a fine stagione nel periodo dell'asciutta.

**RISULTATI** - Gli allevamenti sottoposti a controllo presentavano, in occasione del primo sopralluogo, una produzione media giornaliera variabile da 0,33 a 0,94 litri/capo. In questo sopralluogo abbiamo registrato i dati su un primo scarto effettuato sulle pecore in lattazione. Sono stati riformati, per causa varia, dal 4,2 al 20,0% della consistenza iniziale dei capi pluripari. I capi riformati per mastite corrispondevano ad una quota variabile dal 4,2 al 18,8% della consistenza iniziale. I soggetti riformati per mastite costituivano dal 79,5 al 100,0% del totale dei soggetti riformati. Alla fine del periodo di mungitura veniva effettuata un'ulteriore riforma dei soggetti. In questo ultimo scarto venivano riformati per motivi vari dal 24,2 al 55,3% dei capi sulla consistenza iniziale, di cui, i soggetti riformati per mastite ammontavano ad una quo-

ta variabile dal 17,6 al 54,2%. In totale, i soggetti riformati per mastite variavano dal 62,7 al 97,9% del totale dei soggetti riformati per azienda. La produzione media di latte registrata durante la lattazione si presentava molto variabile tra gli allevamenti, ma in ogni caso decisamente bassa se si considera che nel periodo del campionamento la produzione dovrebbe essere non inferiore a 1,5 litri/die/capo.

È stato possibile stimare una perdita di produzione totale di latte per le aziende, relativamente al giorno del sopralluogo, variabile da un minimo di 61 ad un massimo di 785 litri. Quest'ultimo dato è riferito in particolare ad un'azienda che con 670 pecore in mungitura aveva prodotto solo 220 litri di latte. In generale, la perdita media di latte per capo può essere stimata variabile da 0,56 a 1,17 litri/capo, corrispondente ad una perdita economica variabile da 0,35 a 0,73 euro/capo. Questa perdita è riferita al 2006, ed è stata calcolata facendo riferimento al prezzo medio del latte pecorino industriale di 0,60 euro/litro, così come documentato nei "Listino prezzi all'ingrosso e alla produzione" delle Camere di Commercio isolane.

**CONSIDERAZIONI** - In tutti gli allevamenti monitorati la mastite si è dimostrata di gran lunga la principale causa di riforma dei soggetti. Sul totale dei capi riformati alla fine della lattazione, l'89,6% era stato riformato per mastite. La situazione non si discosta in maniera significativa tra i diversi allevamenti in quanto la percentuale dei soggetti riformati per mastite, sul totale dei riformati, varia dal 62,7 al 97,9%. In un allevamento ovino tipo la rimonta dovrebbe essere del 20-25%. Al contrario, negli allevamenti da noi monitorati, il numero elevato di soggetti riformati per mastite (34,5% della consistenza iniziale con variazioni tra allevamento dal 17,6 al 54,2%) costringeva gli allevatori ad una maggiore percentuale di rimonta. Questa strategia ha comportato maggiori oneri per l'allevatore. Facciamo inoltre notare che lo scarto ha interessato soltanto i soggetti con problemi manifesti e gravi e non tutti i soggetti che, in condizioni normali, sarebbero stati scartati. Questa condizione ha comportato il mantenimento nel gregge di soggetti anziani e con segni di mastite meno evidenti, a tutto discapito del risanamento e della redditività nella stagione successiva. Questa scelta, seppur biasimabile dal punto di vista sanitario, risulta comunque inevitabile per gli allevatori che devono garantirsi un minimo di reddito per il nuovo anno e la possibilità di allevare nuova rimonta; in un contesto di grave sofferenza economica e nell'impossibilità di sopportare l'acquisto di nuovi animali. Infine, tenuto conto che il valore medio di una pecora adulta di razza Sarda (non iscritta al libro genealogico) era pari, nel 2006, a 110 euro, il valore dei capi riformati per mastite è stato stimato variabile da 4.290 a 49.170 euro per le aziende monitorate.

*Ringraziamenti: questo lavoro è stato finanziato al CRENMOC con il progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute RC IZS SA 05/04. Si ringraziano per la collaborazione la Sig.ra Antonella Barbato e i Sig.ri Auzzas Salvatore, Fiori Angelo e Farina Fabrizio.*

■ Partial estimate of economic damage caused by bacterial mastitis in sheep herds in Sardinia

**Key words:** replacement rate, milk, culling.



# Effetto della modifica della tecnica di svezzamento sulla produzione di pecorino Carmasciano



F. MASUCCI<sup>1</sup>, C.M.A. BARONE<sup>1</sup>, M.T. GORGITANO<sup>2</sup>, A. ZULLO<sup>1</sup>, M.L. VARRICCHIO<sup>1</sup>, A. DI FRANCIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali  
Facoltà di Agraria, Università Federico II Napoli

<sup>2</sup> Dipartimento di Economia e Politica Agraria - Facoltà di Agraria, Università Federico II Napoli

**Parole chiave:** agnelli, svezzamento, latte ovino, pecorino di Carmasciano.

**INTRODUZIONE** - Gli sforzi intrapresi negli ultimi anni per la valorizzazione del formaggio tradizionale irpino *Pecorino di Carmasciano*, si sono concretizzati in un *premium price* per le imprese di allevamento e trasformazione che hanno adottato una strategia di differenziazione. Tuttavia, la tecnica di svezzamento abitualmente utilizzata prevede l'allattamento materno fino alla vendita degli agnelli, in genere a 3 mesi di età, con conseguente protratta carenza di latte per la produzione di formaggio. Il sistema adottato risponde alla sola necessità di minimizzare i costi di produzione degli agnelli e, pertanto, non è adeguato alle più recenti scelte aziendali. Ricerche condotte sull'effetto della modifica dello svezzamento su *performance* di accrescimento e qualità della carne in contesti differenti hanno fornito risultati discordanti (Sevi et al., 1999; McKusick et al., 2001; Palazzo et al., 2005; Maiorano et al., 2009). Scopo della sperimentazione è stato di valutare se la riduzione della quantità di latte fornito agli agnelli durante lo svezzamento possa rappresentare una scelta tecnicamente ed economicamente valida per gli allevamenti dell'area.

**MATERIALI E METODI** - La prova è stata condotta in un allevamento ovino (160 pecore; SAU 63 ha), sito a Guardia Lombardi (AV), che produce *Pecorino di Carmasciano*. All'inizio della prova, 22 pecore con i relativi agnelli sono state suddivise in 2 gruppi, omogenei per numerosità, data e ordine di parto, peso, numero e sesso degli agnelli. Per il gruppo di controllo è stata utilizzata l'abituale tecnica di svezzamento, che prevede l'allattamento materno in stalla, al ritorno delle pecore dal pascolo, per 3 mesi. Per il gruppo sperimentale, a partire dal 30° d dal parto, è stata effettuata la mungitura serale delle pecore, prima del ricongiungimento con gli agnelli. I 2 gruppi hanno ricevuto in stalla la medesima integrazione alimentare (fieno *ad libitum* e idonei concentrati del commercio). La produzione latte delle pecore munte è stata rilevata giornalmente a partire dal 30° d dal parto. Gli incrementi ponderali degli agnelli e l'ingestione di alimento sono stati rilevati ogni 2 settimane fino alla macellazione, effettuata all'età di  $90.7 \pm 7.3$  d. Su 4 carcasse per gruppo sono stati prelevati 4 muscoli della coscia (*Gluteobiceps*, *Vastus lateralis*, *Rectus femoris*, *Semimembranosus*) per la determinazione dei principali parametri di qualità della carne (ASPA, 1996). Al fine di valutare la convenienza per l'azienda della modifica sperimentata sono stati rilevati dati tecnici ed economici relativi a gestione del gregge, struttura produttiva, trasformazione del latte e vendita dei prodotti aziendali.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - L'accrescimento degli agnelli è risultato linearmente crescente con l'età e non sono state osservate perdite di peso o malattie. Non sono state rilevate differenze significative tra i due gruppi per l'incremento ponderale medio giornaliero (IMG) e per il peso vivo finale. Gli agnelli del gruppo sperimentale hanno consumato il concentrato di svezzamento in misura maggiore rispetto al controllo (Tabella 1). Questo dato, unitamente alla assenza di differenze statisticamente significative per l'IMG, indica che la mancata somministrazione di latte materno è stata adeguatamente bilanciata dall'apporto di concentrato. I due gruppi hanno evidenziato valori simili per resa alla matazione e grado di adiposità delle carcasse. Non sono state evidenziate differenze significative relativamente ai parametri colorimetrici e tissutali della carne del coscio, fatta eccezione della durezza, che ha evidenziato valori più elevati negli agnelli del gruppo sperimentale (Tabella 1), senza però avere conseguenze nega-

**Tabella 2** - Analisi tecnico - economica della modifica proposta.

	Latte prodotto (kg/anno)	PLV aziendale (€/anno)	Mangime (€/anno)	Lavoro (ore/anno)	
				Mungitura	Caseificazione
Attuale	2,500	29,135	2,755	1,250	225
Modifica	5,370	40,833	3,080	1,880	490

tive sulla qualità percepita dai consumatori locali e sul prezzo di vendita degli agnelli. Per il gruppo sperimentale, la produzione media giornaliera di latte è stata di  $231 \pm 27$  g/capo, con un incremento produttivo medio totale nei due mesi aggiuntivi di mungitura pari a 13.9 kg/capo. Il *surplus* di latte destinato alla produzione di formaggio, proiettato su base annua per l'intero gregge, permetterebbe un aumento della PLV aziendale di € 11.697, che deriverebbe dalla maggiore produzione di formaggio a fronte di un immutato contributo del valore della carne. Infatti, il peso totale degli agnelli è invariato, mentre la maggiore durezza della carne rilevata analiticamente non ha avuto effetti negativi sulla qualità percepita dagli attuali acquirenti, che hanno confermato le precedenti quantità e il prezzo di acquisto. La nuova tecnica di svezzamento impone un incremento dei costi dovuto sia agli alimenti per gli agnelli (+ € 325), sia alle remunerazioni associate al maggior fabbisogno di lavoro (manuale e direttivo), che è soddisfatto dalla manodopera familiare già presente in azienda (Tabella 2). Il risultato netto degli effetti complessivi conferma la convenienza economica della modifica della tecnica di svezzamento. La validità dell'orientamento strategico aziendale è rafforzata, incoraggiando l'approfondimento della differenziazione della sua offerta. La stabilità dei risultati è, tuttavia, strettamente legata a quella dei prezzi di vendita del formaggio. Al fine di non erodere l'attuale *premium price*, attenzione deve essere posta alla costruzione di un solido rapporto con gli acquirenti oltre che all'aumento della loro numerosità.

Gli Autori ringraziano il Sig. Roberto Di Matteo per la collaborazione tecnica.

## ■ Effect of weaning system on pecorino Carmasciano production

**Key words:** lambs, weaning, ewe milk, pecorino Carmasciano.

## Bibliografia

- ASPA. (1996), Centro Stampa Università degli Studi di Perugia. 57-73.  
Maiorano G., Ciarlariello A., Cianciullo D., Roychoudhury S., Manchisi A. (2009), Meat Sci.; 83:577-583.  
McKusick B.C., Thomas D.L., Berger Y.M. (2001), J. Dairy Sci.; 84:1660-1668.  
Palazzo M., Pizzo R., D'Alessandro A.G., Casamassima D. (2005), Proc.13th Nat. Congr. Femesprum, Bari, Italy.  
Sevi A., Napolitano F., Casamassima D., Annicchiarico G., Quarantelli T., De Paola R. (1999), Appl. Anim. Behav. Sci; 64:249-259.

**Tabella 1** - Rilievi *in vivo* e qualità della carne (media ed ES).

Tesi	Rilievi <i>in vivo</i>			Parametri qualitativi del coscio					
	Consumo mangime (g/d)	IMG (g/d)	Resa	Durezza	Resilienza elastica	Masticabilità	L*	a*	b*
Controllo	538 <sup>a</sup> 5.1	260 12.2	55.7	1.22 <sup>a</sup> 0.062	4.82 0.27	292 0.26	50.0 0.38	5.11 0.22	14.2 0.47
Sperimentale	592 <sup>b</sup> 5.1	262 12.2	55.4	1.44 <sup>b</sup> 0.062	4.19 0.27	377 0.26	47.5 0.38	5.13 0.22	14.0 0.47

Lettere diverse in colonna: P<0.05.

# Immunità innata e stato ossidativo in pecore da latte allevate secondo il metodo biologico



L. MOSCATI<sup>1</sup>, A. VALIANI<sup>1</sup>, M.T. LONDINO<sup>2</sup>, E. DURANTI<sup>2</sup>, M. PAUSELLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Applicata - Sezione di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** pecore da latte, immunità innata, stato ossidativo.

**INTRODUZIONE** - La valutazione del benessere degli animali coinvolge più indicatori, come il comportamento, parametri fisiologici, patologie e prestazioni (Broom, 1997). Condizioni ambientali sfavorevoli possono abbassare le funzioni omeostatiche come il sistema immunitario innato, il quale risulta influenzato da fattori di stress ambientale che hanno dimostrato essere significativamente correlati allo stato di salute dell'animale (Moscati e coll., 2003). Il monitoraggio della immunità innata richiede procedure analitiche poco costose ed è quindi applicabile su larga scala. Inoltre lo stato ossidativo del siero è associato con la risposta specifica e non specifica del sistema immunitario. Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare le tendenze e le correlazioni tra alcune caratteristiche di immunità innata e lo stato ossidativo di pecore da latte allevate secondo il metodo biologico.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati misurati i parametri dell'immunità aspecifica umorale (attività battericidica, lisozima, e complemento), dello stato ossidativo (PAO e ROMs) ed il contenuto in cellule somatiche espresse come Linear Score (LS) di 20 pecore primipare di razza Sarda allevate secondo il metodo biologico a partire da 70±5 d dal parto fino a circa 30 d prima della messa in asciutta e per un totale di 5 prelievi.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il lisozima è un enzima che agisce nei confronti di batteri Gram +, presenta un'attività sinergica con il complemento sierico e permette di conoscere l'attività del sistema monocitico macrofagico, indica la presenza di processi infiammatori. Shabanov e coll. (1973) hanno osservato un suo aumento in pecore infettate da *Mycoplasma agalactiae*, benché Mutovin e Mamatov (1978) ne abbiano osservato bassi livelli in pecore con mastiti subcliniche. La concentrazione ottenuta ( $2,10 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$ ) è superiore a quanto osservato da Sotirov e coll. (2005) nel siero di arieti appartenenti a razze ovine a prevalente attitudine carne. L'attività battericida (SBA) è indicativa della capacità siero di inibire la crescita batterica, grazie alla presenza di fattori del complemento e di modeste concentrazioni di anticorpi diretti verso i più diffusi agenti batterici ambientali, principalmente Enterobatteriacee. Essa ha un ruolo fondamentale nei primi stadi infettivi. Il valore medio riscontrato nel presente lavoro ( $38,34 \pm 40,76\%$ ) rileva una forte variabilità all'interno del campione legata sia al singolo soggetto che al momento del prelievo. La titolazione semiquantitativa del complemento emolitico (HCA) permette di valutare sia il rischio di insorgenza di forme patologiche infettive, che la gravità di una patologia già in atto (Walport, 2001). Infatti, il consumo del complemento indica la presenza di immunocomplessi ed è stato riscontrato anche in infezioni parassitarie dei bovini (Boulard e Bencharif, 1984). Relativamente alla specie ovina, mancano valori di riferimento e nella presente indagine il livello di HCA presenta un valore medio di  $23,93 \pm 8,91 \text{ CH50/150 } \mu\text{L}$ . Lo stress ossidativo, dimostrato dall'aumento dei radicali liberi (ROS) e/o da una diminuzione del potere antiossidante (PAO), determina forti danni a livello metabolico e fisiologico (Tse e coll., 2004) con alterazione dello stato immunitario degli animali (Koner e coll., 1996). Nel presente lavoro i livelli medi dei ROMs e del PAO risultano essere rispettivamente pari a  $4,39 \pm 0,88 \text{ mmol/l}$  e  $231,95 \pm 37,94 \text{ } \mu\text{mol HClO neutralizzati}$ . Le correlazioni fra i singoli parametri dell'immunità innata risultano essere molto basse (Tab. 2). Il lisozima e la battericidia presentano una correlazione positiva, confermando la loro funzione di prime difese immunitarie. Il lisozima e l'HCA non presentano, invece, alcuna correlazione evidenziando nel campione considerato una generale assenza di processi infiammatori. La correlazione negativa fra HCA e PAO ( $P < 0,01$ ) sebbene non presenti valori elevati evidenzia la relazione fra attività del complemento e potere antiossidante del plasma che si riduce allorché si vanno a sviluppare processi infiammatori e si ha l'intervento delle difese immunitarie, analoga, sebbene di segno contrario, risulta essere la correlazione fra HCA e ROMs. L'assenza di correlazioni fra parametri dell'immunità innata e LS inducono ad ipotizzare nel presente studio una certa indipendenza fra tali parametri,

**Tabella 1** - Media±DS, minimo e massimo dei parametri dell'immunità aspecifica.

Par.		n.	Media±DS	Min	Max
LYS	$\mu\text{g/ml}$	96	$2,10 \pm 1,21$	0,45	5,71
SBA	%	96	$38,34 \pm 40,76$	1,03	99,38
HCA	$\text{CH50/150 } \mu\text{L}$	96	$23,93 \pm 8,91$	9,63	60,69
ROMs	$\text{mmol/l}$	96	$4,39 \pm 0,88$	2,58	7,19
PAO	$\mu\text{mol CLO neutr.}$	96	$231,95 \pm 37,94$	71,48	326,21
LS		96	$3,35 \pm 1,32$	-0,18	9,76

**Tabella 2** - Correlazioni fra i parametri dell'immunità innata e alcuni parametri qualitativi del latte.

	LYS	SBA	HCA	PAO	ROMs
SBA	0,32**				
HCA	-0,04	-0,18*			
PAO	-0,18*	-0,07	-0,42**		
ROMs	-0,07	-0,09	0,42**	-0,41**	
LS	0,04	-0,09	0,04	-0,06	-0,02

almeno in questo contesto caratterizzato da animali con mammelle sane.

**CONCLUSIONI** - Al fine di conoscere le dinamiche e le interazioni fra i diversi fattori esaminati nel presente lavoro, animali sani dovrebbero essere comparati in condizioni sperimentali con animali infettati o durante infezioni subacute, soprattutto nella fase iniziale dell'infezione o dell'infiammazione. Indagini di campo come la presente possono giocare un ruolo importante nella valutazione dello stato di benessere degli animali allevati e soprattutto nella sua valutazione economica, tenendo conto del fatto che, per quanto riguarda i parametri dell'immunità innata, non esistono valori di riferimento per le pecore nei diversi stadi fisiologici.

Ringraziamenti: ricerca condotta nell'ambito del progetto IMBOL. DM n. 91460 del 06/09/06 - MIPAAF, coord. Prof. Emilia Duranti.

## ■ Native Immunity and Oxidative traits in dairy ewes reared with organic method

**Key words:** dairy sheep, native immunity, oxidative status.

## Bibliografia

- Boulard C., Bencharif F. (1984) Parasite Immunology, 6:459-467.  
 Broom D.M. (1997) Studies of stress in farm animals. Comp. Haemat. Int., 8:94-01.  
 Koner B.C., Banerjee B.D., Ray A. (1997) Immunology Letters, 59:127-131.  
 Moscati L., Stelletta C., Sensi M., Sonaglia L., Battistacci L., (2003) Atti V° Congr Naz. S. I. Di. L. V., 103-104.  
 Mutovin, V.I. & Mamatov, P.M. (1978). Diagnostics of ovine latent mastitis. Veterinaria, No 9, 68-70.  
 Shabanov, M., Toshkov A., Mihailova L., Shirova L. (1973) Veterinary Sciences, 10, 10: 81-84.  
 Sotirov L., Dimitrov V., Djorboneva M. (2006) Bulgarian Journal of Veterinary Medicine (2005), 8, No 2, 83-89.  
 Tse H. M., Milton M.J., Piganelli J.D., (2004) Free Rad. Biol. Med., 36: 233-247.  
 Walport M.J. (2001) N. Eng. J. Med., 344: 209-214.

# Caratteristiche microbiologiche di un formaggio di nicchia: “Il Caprino del Covo”



A. PETRUZZELLI, F. PAOLINI, S. BALDASSARRI, N. ORAZIETTI, F. CIARROCCHI, F. TONUCCI, G. BLASI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** formaggio, latte crudo, Caprino del Covo.

**INTRODUZIONE** - In Italia oltre il 75% di latte caprino viene trasformato in formaggio. La produzione italiana, concentrata nella zona centrale, meridionale e delle isole, è rappresentata da formaggi di tipo tradizionali come i caprini sardi e pugliesi, i Caciocotta caprini, le Tome e i caprini piemontesi e lombardi. Tali prodotti sono prevalentemente a consumo locale tuttavia le peculiari caratteristiche organolettiche e di digeribilità li rendono particolarmente apprezzati dal consumatore. Si tratta quindi di un comparto produttivo da valorizzare in quanto produzioni uniche e non eccedentarie a livello comunitario. In questo lavoro vengono presentati i risultati relativi ad un'indagine preliminare finalizzata alla valutazione dello stato igienico-sanitario di un formaggio caprino a latte crudo semi-stagionato (20-25 gg) tipico della provincia di Pesaro-Urbino.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata svolta presso un caseificio artigianale della provincia di Pesaro-Urbino nel periodo novembre-dicembre 2008.

**Processo produttivo.** Il processo tradizionale di lavorazione di tale formaggio prevede l'utilizzo di latte crudo caprino di razza Camosciata Alpina di provenienza dell'allevamento (stato semibrado) annesso al caseificio oggetto di studio. Al latte appena munto e filtrato, viene aggiunto caglio animale liquido e dopo coagulazione per 12 h ad una temperatura di 18-22°C, si procede alla rottura della cagliata con frusta. Segue lo sgrondo e la salatura in pasta. Infine si procede al travaso in stampi, pressatura manuale e sgocciolamento a temperatura ambiente per 24 h. La stagionatura avviene a 4-6°C per 20-25 giorni. Nel processo produttivo non vengono usate colture starter o lattoinnesti.

**Campionamento.** Sono stati prelevati, in condizioni aseptiche, 9 campioni a vari stadi di maturazione di un unico lotto di produzione: latte crudo, cagliata, formaggio prima della salatura, formaggio dopo la salatura, formaggio a 2 gg, 5 gg, 10 gg, 20 gg, 30 gg.

**Attività analitica.** Tutti i campioni sono stati saggiati per *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* termotolleranti, *E. coli* O157 ed enterotossina stafilococcica utilizzando metodica ELFA. Al fine di valutare la qualità igienica del prodotto, su ciascuna matrice prelevata è stata eseguita la numerazione dei microrganismi a 30°C (PCA, 30°C per 72 h), dei Coliformi totali e di *E. coli* (Coli ID, 37°C per 24-48 h), degli stafilococchi coagulanti positivi e *Staphylococcus aureus* (BP RPE, 37°C per 48 h), del *Clostridium perfringens* (TSC, 37°C per 48 h) e del *Bacillus cereus* (MYP, 30°C per 48 h). Le metodiche utilizzate sono accreditate secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Al fine di determinare la composizione della microflora protettiva autoctona è stato eseguito il conteggio dei lieviti (DRBA, 25°C per 3-5 gg), dei lattococchi mesofili (M17 Agar, 30°C per 48 h) e dei lattobacilli (MRS Agar, 37°C per 72 h in anaerobiosi). Inoltre su ciascun campione è stata effettuata la determinazione dell' $a_w$  e del pH (metodo potenziometrico).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* termotolleranti, *E. coli* O157, enterotossina stafilococcica, *C. perfringens* e *B. cereus*. Nelle prime fasi del processo produttivo (cagliata e prima della salatura) si è riscontrata la presenza dello *S. aureus* con valori di circa  $10^4$  ufc/g; tale germe, oltre a risultare assente nelle fasi successive, non raggiunge concentrazioni favorevoli alla produzione di enterotossina ( $10^5$  ufc/g). *E. coli* presenta valori abbastanza elevati ( $10^5$  ufc/g) nella cagliata, mentre nelle fasi successive subisce un decremento a valori accettabili ( $10^3$  ufc/g). I Coliformi totali mostrano un andamento analogo a quello degli *E. coli* fino a 10 giorni per poi aumentare a valori di circa  $10^6$  ufc/g a fine stagionatura. Le elevate concentrazioni delle colimetrie nelle fasi iniziali sono da ricondurre probabilmente al tipo di lavorazione artigianale e alle temperature di processo utilizzate (T ambiente). La microflora lattica subisce un evidente innalzamento iniziale (cagliata:  $10^7$  ufc/g;  $10^8$  ufc/g) raggiungendo un picco massimo di crescita dopo la salatura ( $10^8$  ufc/g;  $10^9$  ufc/g) rimanendo poi stabile nelle fasi successive fino a fine maturazione. L'incremento repentino di tali germi è probabilmente associato alle temperature di coagulazione (18-22°C) ideali per l'attivazione della fermentazione lattica (coagulazione acida). I lieviti, infine, mostrano un incremento graduale da valori pari a  $10^3$  ufc/g nel latte a valori di  $10^7$  ufc/g a 30 giorni di stagionatura (Grafico 1). Il pH subisce una diminuzione (cagliata) a valori di 4,58 per poi risalire a 5 giorni a valori di 6,02, tale innalzamento è probabilmente correlato con l'attività dei lieviti che a 5 giorni tendono a risalire. L' $a_w$  si abbassa da valori pari a 0,99 a valori di 0,96 (Tabella 1). L'in-

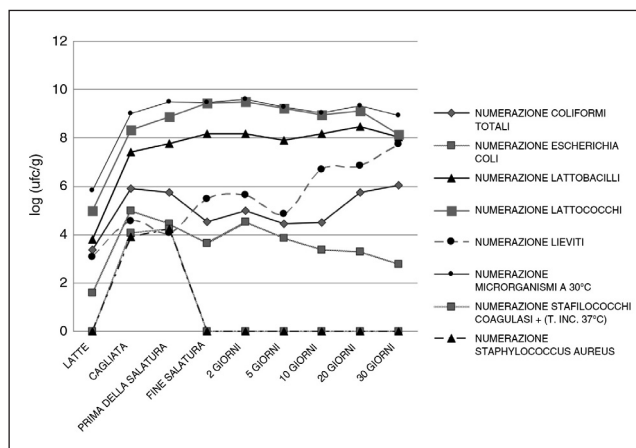


Grafico 1 - Andamento flora microbica.

indagine effettuata ha evidenziato il rispetto dei requisiti sanitari del prodotto analizzato in quanto non sono stati riscontrati germi patogeni e potenzialmente tali. Al fine di effettuare un'ulteriore valorizzazione del prodotto sarebbe interessante svolgere uno studio approfondito della popolazione autoctona; ciò permetterebbe di individuare le specie responsabili del processo di fermentazione utili nella formulazione di colture starter e nella caratterizzazione di tali prodotti che per quanto apprezzati dal punto di vista organolettico necessitano di criteri oggettivi di valutazione.

*Prove eseguite nell'ambito del progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della salute: "Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione di ceppi isoalti da prodotti tradizionali della regione Marche" (RC IZSUM 05/2007).*

Tabella 1 - Andamento dell' $a_w$  e pH.

Tipo campione	$a_w$	pH
Latte	0,99	6,75
Cagliata	0,99	4,58
Prima della salatura	0,99	4,58
Fine salatura	0,97	4,04
2 gg	0,97	4,25
5 gg	0,97	6,02
10 gg	0,97	6,00
20 gg	0,97	5,80
30 gg	0,96	5,70

*Prove eseguite nell'ambito del progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della salute: "Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione di ceppi isoalti da prodotti tradizionali della regione Marche" (RC IZSUM 05/2007).*

## Microbiological characteristics of an Italian niche cheese: the "Caprino del Covo"

**Key words:** goat's milk cheese, raw milk, Caprino del Covo.

## Bibliografia

- Caridi A., Micari B., Foti F., Ramondino D., Sarullo V., (2003), Food Microbiology; 20: 201-209.
- Dolci P., Alessandria V., Zeppa G., Rantsiou K., Cocolin L., (2008), Food Microbiology; 25: 392-399.
- Zumbo A., Di Rosa A.R., Billone B., Carminati D., Girgenti P., Di Marco V., (2009), Italian Journal of Animal Science; 8 (2): 450-452.

# Parassiti degli ovini trasmessi da zecche: osservazioni epidemiologiche in Puglia



E. PIERAGOSTINI<sup>1</sup>, G. DE RUVO<sup>1</sup>, A. ALONGI<sup>2</sup>, S. SCIMECA<sup>2</sup>, A. TORINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dip. PROGESA - Università di Bari

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** TBP, *Anaplasma ovis*, *Theileria ovis*, *Theileria lestoquardi*.

**INTRODUZIONE** - Pretesto per questo lavoro è stata la ricerca di soggetti portatori di *Babesia ovis* ai fini della realizzazione di una azione all'interno del progetto SELMOL finanziato dal MIPAAF tesa ad investigare la risposta genetica alle malattie trasmesse da zecche.

Ripetuti incontri con la babesiosi degli ovini in Puglia, riscontrata clinicamente e confermata dall'indagine microscopica, ci avevano portato a presumere che la probabilità di trovare soggetti portatori di *Babesia ovis* non fosse remota (Pieragostini e Petazzi, 1999). Così è stata avviata un'indagine sul territorio della Murgia barese-tarantina nel quale le esperienze precedenti ci avevano fatto incontrare la babesiosi (Pieragostini & Petazzi, 1999).

Qui vengono riportati i risultati ottenuti da detta indagine la quale, proprio in considerazione degli obiettivi che si prefiggeva, non può che rappresentare un contributo per un eventuale studio epidemiologico dei patogeni trasmessi da zecche (TBP) degli ovini in Puglia.

**MATERIALI E METODI** - Sulla base degli obiettivi della ricerca e della disponibilità limitata di fondi da dedicare a questa parte del lavoro, dopo aver individuato 10 allevamenti disseminati sulla Murgia barese-tarantina, si è proceduto nel periodo maggio-giugno ad un campionamento con metodo non probabilistico.

Negli allevamenti scelti la consistenza numerica del gregge si aggirava intorno ai 200 capi tenuti con sistema semibrado. Così per ogni allevamento sono stati raccolti 15 campioni "di convenienza" per un totale di 150 soggetti appartenenti a razze varie per lo più di origine mediterranea e loro incroci. Per ogni animale sono stati allestiti strisci di sangue periferico per la ricerca microscopica e la valutazione quantitativa della eventuale parassitemia, previa colorazione con Giemsa.

Per le indagini biomolecolari è stata eseguita la Reverse Line Blot Hybridization; i prodotti di PCR specifici per il 18S rRNA della Famiglia *Theileria/Babesia* sono stati ibridizzati su una membrana con i probes specie-specifici per i Piroplasmidi e contenenti un N-terminale (TFA)-C6 amino linker (Isogen). Le specie oggetto di studio sono: *Theileria-Babesia catch all*, *B. crassa*, *B. ovis*, *B. motasi*, *Babesia sp1* (Turkey), *Babesia sp2* Lintan, *Theileria* (*T.*) *annulata*, *T. ovis*, *T. lestoquardi*, *Theileria sp1* China, *Theileria sp2* China (Schnittger et al., 2004). Per la ricerca di microrganismi appartenenti al genere *Anaplasma* (*A.*) sono state eseguite specifiche PCR per *Anaplasma* spp, *A. ovis* (de la Fuente et al., 2007) e *A. phagocytophilum* (de la Fuente et al., 2005).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Il primo risultato incontrovertibile è che la nostra ricognizione non è stata coronata da successo e che il campionamento effettuato non ha portato ad individuare nessun soggetto portatore di *Babesia ovis*. Come si può constatare nella Tabella 1 il

parassita prevalente è l'*Anaplasma ovis* identificato nel 51% dei campioni, seguito da patogeni appartenenti al genere *Theileria* (42,0%) con le specie *T. ovis* (22,3%), *T. lestoquardi* (2,7%) e *T. annulata* (4,5%); la presenza di patogeni appartenenti al genere *Babesia* è irrilevante con una prevalenza del 0,9% e spesso erano presenti infezioni miste con l'*A. ovis*. È noto inoltre che tutte le generalizzazioni ottenute da un campione non probabilistico devono essere filtrate attraverso la conoscenza del tema oggetto di studio ed in questo caso i risultati ottenuti vanno a dettagliare precedenti osservazioni. In particolare, un precedente lavoro condotto sulla razza ovina Gentile di Puglia aveva consentito di constatare, attraverso l'indagine microscopica sugli strisci ematici, una positività del 93% di parassiti emotropici trasmessi da zecche tra i quali l'*Anaplasma* spp. era il più rappresentato (Pieragostini et al, 2006).

Questi i dati di prevalenza microscopica e positività biomolecolare, confermano quanto affermato da Stoltz (1994), il quale citava l'anaplasmosi quale rickettsiosi persistente di ovini e caprini ed endemica di parte del sud e centro Europa oltre che dei paesi tropicali e sub tropicali dell'Africa, dell'Asia e dell'ovest degli USA.

Questa stabilità enzoootica, accanto al fatto che gli animali da reddito autoctoni pugliesi, come pure quelli originari delle regioni del sud Italia, sono meno suscettibili ai TBP rispetto a razze originarie di regioni settentrionali (Pieragostini & Petazzi, 1999), andrebbe considerata con attenzione non solo da un punto di vista biologico, ma soprattutto in funzione della movimentazione degli animali in altre regioni italiane dove a seguito del riscaldamento globale, la probabilità di diffusione delle patologie trasmesse da zecche va crescendo.

## ■ Tick born pathogens in sheep in Apulia: observational data

**Key words:** TBP, *Anaplasma ovis*, *Theileria ovis*, *Theileria lestoquardi*.

## Bibliografia

- de la Fuente J., Massung R.F., Wong S.J., Chu F.K., Lutz H., Meli M., von Loewenich F.D., Gzieszczuk A., Torina A., Caracappa S., Mangold A.J., Naranjo V., Stuenkel S., Kocan K.M. Sequence Analysis of the msp4 Gene of *Anaplasma phagocytophilum* Strains. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 1309-1317.
- de la Fuente, J., M.W. Atkinson, V. Naranjo, I.G. Fernández de Mera, A.J. Mangold, K.A. Keating, and K.M. Kocan. 2007. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma ovis* strains. Vet. Microbiol. 119: 375-381.
- Pieragostini, E.; Petazzi F. (1999) Genetics and tolerance to tick-borne diseases in South Italy: experience in studying native Apulian and exotic sheep breed. Parassitologia. 41 Suppl 1, 89-94.
- Pieragostini, E., Rubino, G., Bramante, G., Rullo, R., Petazzi F., Caroli A. (2006) Functional effect of haemoglobin polymorphism on the haematological pattern of Gentile di Puglia sheep. J. Anim. Breed. Genet., 123, 122-30.
- Schnittger L., Yin H., Qi B., Gubbels M.J., Beyer D., Niemann S., Jongejan F., Ahmed J.S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol Res, 92:189-96.
- Stoltz, W.H. (1994) Ovine and caprine anaplasmosis. In: Infectious diseases of livestock, 2nd ed Coetzer, JAW Thomson, GR and Tustin, RC (eds) Oxford University Press, Oxford, pp. 431-438.

**Tabella 1** - Prevalenza di TBP nel campione analizzato con indicazioni della presenza di parassiti del genere *Anaplasma* (*A.*), *Theileria* (*T.*) e *Babesia*.

Tipo Analisi	<i>A. ovis</i>	<i>T. spp</i>	<i>T. ovis</i>	<i>T. lestoquardi</i>	<i>T. annulata</i>	<i>Babesia spp</i>
Microscopica	44%	27%	-			
Molecolare	51,0%	42,0%	22,3%	2,7%	4,5%	1,8%



# Imponente perdita di miniboli per l'identificazione elettronica di capre di razza Maltese



W. PINNA<sup>1</sup>, G. NIEDDU<sup>1</sup>, M. PICCIAU<sup>1</sup>, M.G. CAPPAL<sup>1</sup>, M.P.L. BITTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Produzioni Animali, Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Sassari  
Via Vienna, 2 - 07100 Sassari

<sup>2</sup>Associazione Interprovinciale Nuoro-Ogliastra - Via Alghero, 6 - 08100 Nuoro

**Parole chiave:** RFID (identificazione a radio frequenza); EID (identificazione elettronica); miniboli.

**INTRODUZIONE** - L'impiego dell'identificazione elettronica su larga scala, come avviene in Sardegna nei piccoli ruminanti, offre l'opportunità di verificare praticamente l'eventuale insorgenza di problematiche che coinvolgono gli operatori del settore: in particolare, di affrontare la problematica segnalata, al fine di adottare un protocollo operativo di intervento alle necessità di campo. Nella presente nota, si riporta la segnalazione di una serie di eventi di perdita di miniboli ceramici che vengono utilizzati per l'identificazione degli animali in giovane età.

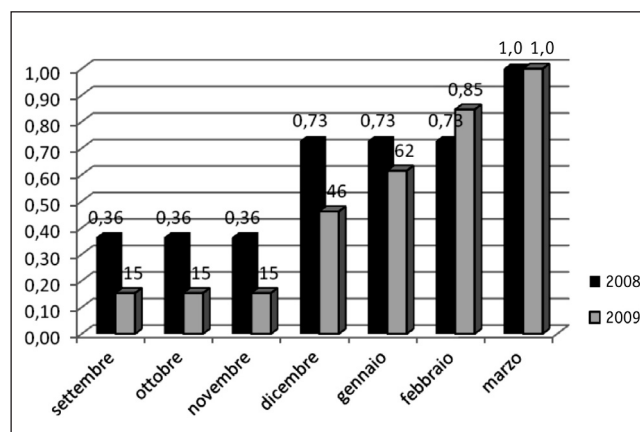
**MATERIALI E METODI** - La casistica descritta si è verificata nel biennio 2008-2009 in un allevamento del centro Sardegna di capre di razza Maltese, in seguito all'applicazione di 65 boli, c. d. miniboli ceramici endoruminari (70 x 21 mm, 20 g) muniti di transponder (32,5 x 3,8 mm) con tecnologia Half Duplex. Nel periodo considerato, sono stati segnalati 24 casi di mancata lettura del codice del transponder. La mancata leggibilità del codice dei transponder è stata regolarmente registrata ai controlli funzionali per la produzione del latte da parte dell'operatore. L'accertamento della presenza (mancata funzionalità del dispositivo) o dell'effettiva perdita del bolo applicato (mancanza del dispositivo) all'animale è avvenuto mediante radiografia in proiezione latero-laterale del fianco sinistro dell'animale, eseguita con apparecchio radiografico digitale portatile, in due sedute di diagnostica per immagini, effettuate direttamente in allevamento su animali per i quali non è stato possibile rilevare il codice del transponder mediante lettore portatile in dotazione all'operatore, secondo le procedure di Help Desk codificate da Pinna *et al.* (2007).

**RISULTATI** - Nel periodo considerato, la segnalazione dei 24 casi di mancata lettura del codice del transponder contenuto nei miniboli somministrati agli animali, si è in realtà rivelata un'imponente perdita di transponder pari a un tasso di prevalenza del 36,9% (Tabella 1). L'entità della perdita del minibolo da parte degli animali segnalati, accertata mediante esame radiografico, ha manifestato un tasso di prevalenza del 37,9% nei nuovi identificati dell'anno 2008. La prevalenza è stata del 38,2% nei nuovi identificati del 2009.

**CONCLUSIONI** - L'opportunità offerta dalla casistica descritta ci ha consentito di: 1) ribadire la validità dell'impiego delle radiografie ai fini della discriminazione certa tra perdita e malfunzionamento del transponder applicati agli animali; 2) rimarcare la fondamentale importanza della sperimentazione preliminare di supporti ceramici non adeguatamente testati in condizioni di campo. Nella specie caprina che, rispetto a quella ovina, può già presentare maggiore propensione alla perdita del bolo ceramico anche se non nelle proporzioni davvero eccezionali riportate in questa nota, tale sperimentazione è decisamente importante.

**Tabella 1** - Capi identificati, boli somministrati e tasso di prevalenza di perdita dei boli negli anni 2008 e 2009.

Annualità	2008	2009	Totale
Capi EID	29	34	65
Boli Z20 (70x21mm, 20g)	29	34	65
Miniboli persi	11	13	24
Prevalenza (%)	37.9	38.2	36.9



**Grafico** - Frequenza cumulata delle perdite dei boli in occasione dei controlli funzionali effettuati dall'operatore nell'anno 2008 e 2009 (identificazione capi n = 29 aprile 2008 e n = 34 aprile 2009).

## Huge loss of miniboluses for electronic identification of maltese breed goats

**Key words:** RFID (radio frequency identification); EID (electronic identification); miniboluses.

## Bibliografia

- Associazione Regionale Allevatori della Sardegna - Progetto IESA, giugno 2006.
- Caja G., Conill C., Nehering R., Ribó O., (1999). Development of a ceramic bolus for the permanent electronic identification of sheep, goat and cattle. *Comput. Elect. Agric.* 24 pp 45-63.
- Gazzetta Ufficiale Delle Comunità Europee N. L 5/8 del 09/01/2004. Regolamento CE 21/2004.
- International Standardisation Organisation (ISO), (1994). Draft International Standard (DIS), ISO/DIS 11784. Agricultural equipment. Radiofrequency identification of animals. Code structure.
- International Standardisation Organisation (ISO), (1995). Draft International Standard (DIS), ISO/DIS 11785. Agricultural equipment. Radiofrequency identification of animals. Technical concept.
- Pinna W., Sedda P., Delogu G., Moniello G., Sionis G.F., Solinas I.L., (2004). Identificazione Elettronica Nell'allevamento Ovinico da Latte. Atti XIV Congresso Nazionale SIPAOC, Siena (Si) 28 Sett - 2 Ottobre.
- Pinna W., Cappai M.G., Sedda P., Garau G., Sfunzia A., Bitti M. (2006). Anagrafe ovina: identificazione elettronica (EID) vs tatuaggio auricolare in agnelli di razza sarda. Atti S.I.P.A.O.C., 25-28 Oct.
- Pinna W., Cappai M.G., Garau G., Sfunzia A., Nieddu G., Bitti M.P.L. (2007). Electronic identification (EID) vs Ear Tattoo (ET) during controls on milk production of sarda sheep. Book of abstracts 5th International Symposium on the challenge to sheep and goat milk sectors FIL - IDF, Alghero (Italy) 18-20 Apr.
- Pinna W., Cappai M.G., Garau G., Sfunzia A., Picciau M., Bitti M.P.L. (2007). First results about a Help Desk service on electronic identification in sheep. *Proceedings of the 58th EAAP Congress.*

# Espressione genica differenziale in capre infettate con *Staphylococcus aureus*



G. PISONI<sup>1</sup>, P. CREMONESI<sup>2</sup>, R. CAPOFERRI<sup>3,4</sup>, F. STROZZI<sup>3,5</sup>, A. STELLA<sup>2,5</sup>, P. MODESTO<sup>1,6</sup>, M. DEL CORVO<sup>2</sup>, L. SCACCABAROZZI<sup>1</sup>, P. MORONI<sup>1</sup>, J. WILLIAMS<sup>3,5</sup>, B. CASTIGLIONI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup> IBBA-CNR, UOS di Lodi

<sup>3</sup> IDRA Lab, Lodi

<sup>4</sup> Istituto Sperimentale Italiano "L. Spallanzani", Lodi

<sup>5</sup> Parco Tecnologico Padano, Lodi

<sup>6</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta

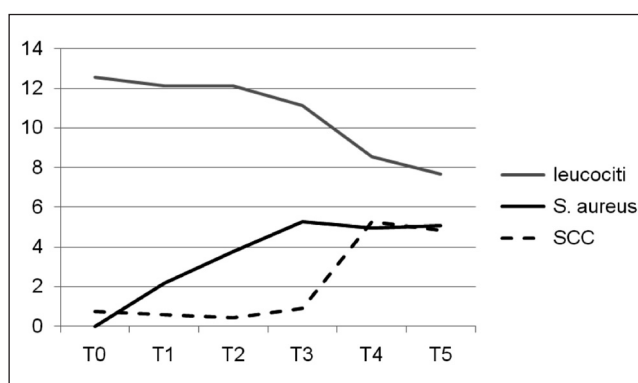
**Parole chiave:** mastite, *Staphylococcus aureus*, microarray.

**INTRODUZIONE** - Gli Stafilococchi sono i microrganismi che più frequentemente vengono isolati in caso di infezioni mammarie negli allevamenti caprini italiani. Tra questi *Staphylococcus aureus* è considerato il più patogeno. Le difese immunitarie a livello di mammella caprina rappresentano il principale meccanismo di difesa contro le infezioni da *S. aureus*. L'analisi mediante microarray rappresenta uno strumento efficace per esaminare contemporaneamente l'espressione di migliaia di geni a livello tissutale in condizioni fisiologiche e patologiche (Pisoni et al., 2010). Scopo del presente lavoro è studiare l'espressione genica dei leucociti del latte e del sangue in corso di infezione mammaria con *S. aureus* in capre mediante l'utilizzo di microarray custom Combimatrix (Panelli et al., 2010).

**MATERIALI E METODI - Animali.** L'analisi è stata effettuata su 10 capre primipare di razza Camosciata delle Alpi selezionate per alto e basso contenuto di cellule somatiche nel latte (SCC) e a circa 40 giorni dal parto. **Infezione Sperimentale.** La mammella sinistra di ogni capra è stata inoculata con  $10^3$  ufc di *S. aureus*, mentre la mammella destra con soluzione fisiologica. Prima dell'infezione (T0) e a 6 (T1), 12 (T2), 18 (T3), 24 (T4) e 30 (T5) ore post-infezione sono stati prelevati campioni di latte per l'isolamento delle cellule somatiche e campioni di sangue per l'isolamento dei leucociti. Durante la prova sono state monitorate la temperatura corporea, la produzione di latte, SCC e conta batterica di *S. aureus* nel latte e la formula leucocitaria del sangue.

**Analisi mediante microarray custom ad oligonucleotidi.** L'RNA estratto mediante Trizol (Invitrogen) dalle cellule somatiche del latte e dai leucociti del sangue è stato analizzato quali-quantitativamente mediante Agilent Bioanalyser 2100. Un µg di RNA totale purificato è stato amplificato e marcato con Cy5 mediante il kit RNA ampULSe (Kreatech). 4 µg di aRNA (antisense RNA) sono stati quindi ibridati su un microarray contenente 90.000 sonde oligonucleotidiche bovine della lunghezza di 35 bp, rappresentative di circa 43.000 trascritti bovini, appositamente disegnate e sintetizzate *in situ* su piattaforma Combimatrix. **RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Infezione sperimentale.** In seguito all'inoculazione di *S. aureus* nella mammella sinistra si è osservata, nelle 30 ore successive, la comparsa di un processo infiammatorio caratterizzato da un rialzo termico di 1.2°C, un calo della produzione di latte (-500 ml), un aumento medio del SCC da 0.7 a  $4.3 \times 10^6$  cellule/ml e una carica batterica media di *S. aureus* fino a  $46 \times 10^6$  ufc/ml, mentre a livello ematico si è osservato un calo dei leucociti totali da  $12.6$  a  $7.7 \times 10^3$  cellule/ml (Fig. 1). Non sono state evidenziate differenze significative fra i due gruppi selezionati in funzione del contenuto di cellule somatiche del latte e della conta batterica totale.

**Analisi dell'espressione genica differenziale nel latte.** Dall'analisi microarray 300 geni sono risultati differenzialmente espressi tra i time point T0 e T4 e 128 geni tra T0 e T5, con p value < 0.01 e log fold change > 1.5. Nessuna differenza è stata invece riscontrata tra T0 e T1, T2 e T3. Non sono state evidenziate neanche differenze significative fra i due gruppi selezionati per SCC. Sono stati analizzati i pathway molecolari dei geni differenzialmente espressi e, sulla base di questi, sono stati scelti 11 geni da utilizzare per la validazione mediante real-time PCR (myeloid differentiation primary response; thrombomodulin fragment; toll-like receptor 4 precursor; tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6; leukocyte elastase inhibitor; colony stimulating factor 3 re-



**Figura 1** - Leucociti totali del sangue (x104/ml), conteggio delle cellule somatiche del latte (SCC x 106/ml) e conta dello *Staphylococcus aureus* nel latte (LOG ufc/ml) nel periodo pre-infezione e a 6 (T1), 12 (T2), 18 (T3), 24 (T4) e 30 (T5) h post-infezione.

ceptor (granulocyte); complement C3 precursor; pellino protein; T-cell activation Rho GTPase-activating protein; IL-18 receptor beta fragment; pentraxin-related protein PTX3).

**Analisi dell'espressione genica differenziale nel sangue.** L'analisi ha evidenziato differenze tra i time point T0 e T5 a livello di 7 geni con p value < 0.01 e log fold change > 1.5.

Non sono state rilevate differenze nell'espressione genica tra i time point T0 e T1, T2, T3 e T4. Non sono state neppure evidenziate differenze significative fra i due gruppi selezionati per SCC. Per la validazione in real-time PCR sono stati scelti quattro geni (pentraxin-related protein PTX3; egf-like module containing mucin-like, hormone receptor-like precursor; similar to egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence; calgranulin-A) tra quelli risultati differenzialmente espressi tra T0 e T5.

**Validazione mediante Real time PCR.** Sono in corso gli esperimenti di Real time PCR con Sybr Green.

## ■ Identification of caprine differentially expressed genes induced by *S. aureus* intramammary infection by means of Combimatrix microarray technology

**Key words:** mastitis, *Staphylococcus aureus*, microarray.

## Bibliografia

- Panelli S, Strozzi F, Capoferri R, Barbieri I, Martinelli N, Capucci L, Lombardi G, Williams J. (2010), Journal of Toxicology and Environmental Health; in press.
- Pisoni G, Pisoni G, Moroni P, Genini S, Stella A, Boettcher PJ, Cremonesi P, Scaccabarozzi L, Giuffra E, Castiglioni B. (2010), Veterinary Immunology and Immunopathology; 135 (3-4): 208-17.

# Contenuto in antiossidanti nel latte e formaggio ovini ottenuti con metodo biologico



V. ROSCINI<sup>1</sup>, E. MOURVAKI<sup>1</sup>, L. BIANCHI<sup>1</sup>, D. DONNINI<sup>1</sup>, A. VALIANI<sup>2</sup>, E. DURANTI<sup>1</sup>, M. PAUSELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Applicata, Università degli Studi, Perugia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

**Parole chiave:** pecora da latte; allevamento biologico, vitamine liposolubili, stabilità ossidativa.

**INTRODUZIONE** - L'intensivizzazione del sistema di allevamento coinvolge anche il biologico senza una effettiva conoscenza degli effetti che può determinare sui alcuni parametri qualitativi del latte e dei derivati ed in particolare su alcuni componenti minori quali carotenoidi e tocoferoli. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il livello in vitamine liposolubili ed attività antiossidante nel latte e nel formaggio ottenuti a partire da strategie alimentari con diverso livello di impiego del pascolo.

**MATERIALI E METODI** - La sperimentazione ha coinvolto 5 allevamenti con diversi gradi di intensivizzazione della gestione alimentare: G: pascolo turnato per 12-14 h/d + 100 g di concentrato; GC: pascolo per 12-14 h/d + 420 g/capo/d concentrato; GCH: pascolo per 8 h/d + fieno di lupinella 500g/capo/d + 600 g/capo/d concentrato; GCH1: pascolo per 8-10 ore + fieno di medica 500g/d + 400 g/capo/d di concentrato; TMR: alimentazione unifeed composto di insilato di mais, fieno di medica e concentrati, pascolo durante il solo periodo di asciutta. I campionamenti sono stati effettuati, per ogni azienda, secondo la seguente cronologia: raccolta delle essenze pascolate per tre giorni consecutivi dopo valutazione della composizione botanica del pascolo, raccolta negli stessi giorni dei campioni di latte e formaggio (30 d di stagionatura), ottenuto dalla trasformazione del latte raccolto nei tre giorni di campionamento. I diterpeni (tocopherolo e tocotrienoli) e carotenoidi nel latte e nel formaggio sono stati determinati previa estrazione secondo i metodi proposti da Hammevose e coll. (2004) e da Hulshof e coll. (2006). La stabilità ossidativa di latte e formaggio è stata valutata dosando il livello di malondialdeide (MDA) mediante HPLC secondo la metodica proposta da Fenaille e coll. (2001). Tutti i dati relativi alle caratteristiche chimiche del latte e del formaggio sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo un modello monofattoriale che teneva conto dell'effetto dell'allevamento.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nel latte raccolto nell'allevamento con alimentazione unifeed si osserva la totale assenza di  $\alpha$ -tocotrienolo e più in generale i livelli più bassi di  $\alpha$ -tocopherolo, retinolo e luteina.

Il tenore in  $\alpha$ -tocopherolo riscontrato negli altri lattini risulta essere molto simile a quella riscontrato da Galina e Haenlein (2004) e da Pizzoferrato et al. (2007) nel latte di capre alimentate al pascolo e da Calderon e coll. (2007) in latte bovino. I valori di retinolo risultano essere inferiori a quanto riportato da Raynal-Ljutovac e coll. (2008) su latte di pecora e molto simili a quelli riportati da Calderon e coll. (2007) anche per quanto riguarda la luteina. I livelli di MDA non risultano essere diversi fra gli allevamenti considerati evidenziando, comunque, nel complesso, una minore stabilità ossidativa rispetto al formaggio. I contenuti di tocoferoli, retinolo e luteina in quest'ultimo (Tab. 2) presentano un andamento molto simile a quello riscontrato nel latte. Relativamente alla stabilità ossidativa, essa è risultata minore in quello prodotto a partire da latte delle pecore alimentate con unifeed rispetto a quello ottenuto a partire da latte di pecore allevate prevalentemente al pascolo.

La sensibilità alla luce da parte sia di retinolo che luteina può spiegare la perdita di tali micronutrienti durante la caseificazione e la stagionatura. Il retinolo, inoltre, tende a legarsi con le proteine del siero ed in particolare con l' $\alpha$ -lattalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina andando a formare complessi solubili in acqua (Puyol et al., 1991) determinandone una ulteriore perdita nel siero. La riduzione del contenuto in luteina è giustificata dal fatto che essa come la zeaxantina, quali carotenoidi polari con due gruppi idrossilici, si distribuisce preferenzialmente sulla superficie del globulo di grasso facilitandone il trasferimento nel siero (Borel et al., 1996).

**CONCLUSIONI** - Il minor contenuto in vitamine liposolubili nel latte e nel formaggio prodotti da animali alimentati con unifeed, evidenzia come nell'ambito del biologico e più in generale dell'allevamento ovino, l'abbandono di pratiche di allevamento che prevedono il pascolo come fonte principale di alimento non paghino in termini di caratteristiche

**Tabella 1** - Medie stimate di tocoferoli, retinolo e carotenoidi nel latte prodotto dalle diverse aziende.

Parametri	Allevamenti					RMSE
	G	GC	GCH	GCH1	TMR	
$\alpha$ -tocot. ng/ml	275	222	278°	190b	-	73
$\delta$ -tocof. ng/ml	10A	12A	10A	3B	8AB	4
$\gamma$ -tocof. ng/ml	132AB	175A	234A	97B	113B	41
$\alpha$ -tocof. ng/ml	1136AB	948B	1438A	1155AB	181C	225
Retinolo ng/ml	567	358C	674A	433B	67D	42
Luteina ng/ml	23C	50A	59A	39B	9D	5
TBARS $\mu$ g/g gr	7	8	7	8	8	1

A, B: P<0,01; a, b: P<0,05.

**Tabella 2** - Contenuto in tocoferoli, carotenoidi e valutazione della stabilità ossidativa del formaggio.

Parametri	Allevamenti					DSE
	GC	G	GCH	GCH1	TMR	
$\alpha$ -tocotr. ng/g	31B	93A	42B	60B	-	17
$\delta$ -tocof. ng/g	10B	23A	19A	14B	20A	5
$\gamma$ -tocof. ng/g	55B	70A	90A	49B	67AB	14
$\alpha$ -tocof. ng/g	386A	202B	394A	413A	83C	40
Retinolo ng/g	182A	135A	204A	132A	83B	34
Luteina ng/g	2B	3B	6A	2B	-	0,7
TBARS $\mu$ g/g gr	0,20b	0,13b	0,19b	0,11b	0,35a	0,07

A, B, C: P<0,01; a, b: P<0,05.

nutrizionali delle produzioni. Il pascolamento, inoltre, oltre ad essere la pratica di alimentazione più a basso costo contribuisce alla salvaguardia del territorio ed al mantenimento della tipicità delle produzioni.

*Ringraziamenti: ricerca condotta nell'ambito del progetto IMBOL. D.M. n. 91460 del 06/09/06 - MIPAAF coordinatore prof. Emilia Duranti.*

■ **Antioxidant content in ewe milk and cheese obtained according to organic method**

**Key words:** Ewe milk, cheese, vitamin content, oxidative stability.

## Bibliografia

- Borel G., P. Grolier, M. Armand, A. Partire, H. Lafont, D. lairon, V. Azais-Braesco (1996) - J. Lipid Res. 37: 250-261.  
 Calderon F., B. Chauveau-Dutlot, B. Martin, B. Graulet, M. Doureau, P. Nozière. (2007) - J. Dairy Sci. 90:2335-2346.  
 Galina M., G.F.W. Haenlein (2004) - In proc. Abstr. 8th Intern. Conf. Goats, Pretoria (South Africa), 4-9 July 2004, pp 564-565.  
 Havemose H., Riiswbjerg M., Wender L., Bredie P. Nielsen J.H. Int. Dairy J. 14:563-570.  
 Hulshof P.J.M., van Roekel-Jensen T., v de Bovenkamp P., Clive West E. (2006) - 19:67-75.  
 Pizzoferrato L.P. Manzi, S. Marconi, V. Fedele, S. Claps, R. Rubino (2007)-J. Dairy Sci, 90:4569-4574  
 Puyol P., M.D. Perez, J.M. Ena, M. Calvo - (1991) Agric. Biol. Chem. 55:2515-2520.

# Valutazione dei parametri lattodinamografici sul latte bovino, ovino e caprino congelato



M. TODARO<sup>1</sup>, M.L. SCATASSA<sup>2</sup>, L. ARCURI<sup>3</sup>, P. GIACCONE<sup>1</sup>, S. CARACAPPA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo. - Sezione di Produzioni Animali. Università di Palermo

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo

<sup>3</sup> Azienda Sanitaria Provinciale di Palermo

**Parole chiave:** parametri lattodinamografici, latte bovino, ovino e caprino.

**INTRODUZIONE** - L'attitudine alla coagulazione presamica del latte rappresenta un requisito di primaria importanza nella valutazione tecnica di un latte destinato alla produzione di formaggio. Sebbene l'utilizzazione del Formagraph sia stata oggetto di studio dalla Commissione ASPA del latte<sup>1</sup> per gli insoddisfacenti valori di ripetibilità e di riproducibilità, rimane ad oggi l'unico strumento in grado di fornire un'indicazione analitica sull'attitudine casearia del latte.

I parametri lattodinamografici (LDG) rappresentati dal tempo di coagulazione ( $r$ ), dal tempo di formazione del coagulo ( $K_{20}$ ) e dalla consistenza della cagliata ( $a_{30}$ ), forniscono quindi delle indicazioni oggettive per la individuazione del comportamento tecnologico del latte destinato alla caseificazione. Considerato che i risultati sono influenzati dal tempo intercorrente fra la mungitura e l'esecuzione delle analisi e che non sempre è possibile analizzare i campioni entro 24h dalla mungitura, l'oggetto del presente lavoro è stato quello di valutare l'influenza del congelamento dei campioni di latte e delle relative tecniche di scongelamento sui parametri lattodinamografici.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto presso l'azienda "Giardinello" dell'Istituto Sperimentale Zootecnico per la Sicilia su quattro campioni di latte di massa bovino, ovino e caprino, prelevati con cadenza mensile, da Marzo a Giugno. I campioni sono stati prelevati dal latte prodotto durante la sola mungitura del mattino. Ciascun campione è stato suddiviso in 81 aliquote da 40 ml ciascuna, di queste 9 sono state subito utilizzate per la determinazione dei parametri lattodinamografici su latte fresco secondo Annibaldi<sup>2</sup> e le restanti 72 sono state congelate a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dopo un mese, per ogni campione di latte di massa, sono state sottoposte a prova 18 aliquote, previo scongelamento secondo due distinte procedure. Lo scongelamento rapido veniva effettuato immergendo il rack con le nove aliquote di latte in bagnomaria a  $+42^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti; lo scongelamento lento, ponendo le provette in frigorifero a  $4^{\circ}\text{C}$  per 24h.

Le stesse procedure sono state eseguite per ognuno dei quattro campioni delle tre specie animali al secondo, terzo e sesto mese dal congelamento. In totale sono state eseguite 1296 determinazioni utilizzando il Formagraph (Foss Italia); la metodica prevede il riscaldamento di 10 ml di latte a  $35^{\circ}\text{C}$  e l'aggiunta di 200 ml di caglio Hansen a titolo 1:10.000, diluito all'1,6% per il latte bovino e caprino e allo 0,8% per il latte ovino, al fine di indurre la formazione del coagulo. L'attitudine alla coagulazione viene espressa attraverso i seguenti parametri lattodinamografici:  $r$  (tempo di coagulazione, in minuti),  $a_{30}$  (consistenza del coagulo rilevata dopo 30 minuti dall'aggiunta del caglio ed espressa in mm) e  $K_{20}$  (velocità di formazione del coagulo espressa in minuti).

I dati sono stati sottoposti ad elaborazione matematico-statistica utilizzando un modello Nested in cui l'interazione metodo di scongelamento (lento e rapido) per durata del congelamento (1, 2, 3 e 6 mesi) è stata testata all'interno di ciascuna specie.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Le medie stimate dei parametri lattodinamografici, per ogni specie animale, sia del latte fresco sia del latte congelato sono riportate nella Tabella 1.

L'analisi di varianza ha evidenziato un effetto significativo sui parametri lattodinamografici dei fattori specie animale, metodo di scongelamento e durata del congelamento. Il tempo di coagulazione ( $r$ ) dei campioni scongelati con metodo rapido è stato significativamente più basso rispetto ai campioni scongelati con metodo lento.

Nei campioni di latte di capra si è osservata una significativa riduzione della consistenza della cagliata in funzione del tempo di congelamento, non osservata nelle altre specie. Per tale particolarità, di non facile interpretazione, sono in corso ulteriori indagini per valutare l'influenza di

**Tabella 1** - Medie stimate dei parametri LDG.

Specie	Tempo cong.to	Metodo scongel.to	$r$ (min)	$a_{30}$ (mm)	$K_{20}$ (min)
Bovina	Latte fresco		20,78	24,08	2,85
	1 mese	lento	19,26	23,85	2,52
	1 mese	rapido	18,35	23,25	2,02
	2 mesi	lento	20,15	24,28	2,87
	2 mesi	rapido	18,04	25,62	3,80
	3 mesi	lento	20,01	20,52	1,14
	3 mesi	rapido	18,15	24,77	3,88
	6 mesi	lento	23,78	22,75	2,31
	6 mesi	rapido	21,12	16,50	1,44
Caprina	Latte fresco		15,93	23,92	1,97
	1 mese	lento	13,92	25,90	2,97
	1 mese	rapido	13,18	20,56	1,71
	2 mesi	lento	15,04	22,66	2,54
	2 mesi	rapido	13,67	21,42	1,83
	3 mesi	lento	16,31	16,55	1,49
	3 mesi	rapido	13,71	18,74	1,63
	6 mesi	lento	17,08	11,08	0,97
	6 mesi	rapido	14,77	17,17	1,57
Ovina	Latte fresco		17,97	34,50	1,27
	1 mese	lento	19,20	36,76	1,51
	1 mese	rapido	19,59	35,85	1,59
	2 mesi	lento	17,68	36,90	1,69
	2 mesi	rapido	15,12	26,34	1,76
	3 mesi	lento	17,00	37,61	1,63
	3 mesi	rapido	15,20	25,98	1,45
	6 mesi	lento	17,94	35,61	1,94
	6 mesi	rapido	17,08	38,15	1,76

altri parametri sulla prova lattodinamografica effettuata. Dai dati esposti emerge che il congelamento del latte ovino e bovino seguito da uno scongelamento lento non altera eccessivamente i parametri lattodinamografici. Pertanto il congelamento potrebbe essere proposto come metodo di conservazione dei campioni per i quali non è possibile assicurare il recapito in laboratorio lo stesso giorno della mungitura, in tempo utile per l'esecuzione degli esami di laboratorio.

*Si ringraziano A. Carrozzo, B. Bucato e S. Alfano per la preziosa collaborazione tecnica.*

## ■ Cheese making ability of bovine, ovine and caprine freezing milk

**Key words:** clotting ability; cow, goat and ewe's milk characteristics.

## Bibliografia

1. ASPA, Commissione metodologie di valutazione della produzione quanti-qualitativa del latte. (1999) - Ripetibilità e riproducibilità dell'analisi lattodinamografica per la valutazione dell'attitudine alla coagulazione presamica del latte bovino. Zoot. Nutr. Anim., 25: 219-227.
2. Annibaldi S., Ferri G., Mora R. (1977) - Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: tipizzazione lattodinamografica. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 28 (2): 115-126.



# Resistenza genetica ai parassiti gastrointestinali in due razze ovine italiane



G. VENDITTI<sup>1</sup>, N. D'AVINO<sup>1</sup>, C. SEBASTIANI<sup>1</sup>, P. CALZONI, L. MOSCATI<sup>1</sup>,  
M. BIAGETTI<sup>1</sup>, F. CECCHI<sup>2</sup>, R. CIAMPOLINI<sup>2</sup>, F. MACCHIONI<sup>3</sup>, F. FILIPPINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche, Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Università di Pisa

<sup>3</sup> Dipartimento di Patologia Animale, Università di Pisa

**Parole chiave:** resistenza genetica, parassiti gastrointestinali, ripetibilità, ereditabilità.

**INTRODUZIONE** - Le parassitosi gastrointestinali rappresentano una tra le più frequenti cause di diminuzione della produttività negli ovini. Il livello di infestazione di un animale e la sua resistenza dipendono da numerosi fattori sia endogeni che esogeni che possono agire indipendentemente o congiuntamente. L'adozione di strategie di intervento integrate può limitare l'insorgenza delle parassitosi: la selezione genetica mediante marcatori di resistenza potrebbe rappresentare uno dei possibili approcci. L'individuazione dei fenotipi resistenti alle parassitosi gastro-intestinali e la stima della trasmissibilità ereditaria della resistenza rappresenta la fase preliminare di un programma di selezione genetica. La relazione fra caratteri fenotipici e genotipo è espressa dal coefficiente di *ereditabilità*, che può essere calcolato mediante la conta delle uova fecali (FEC) e l'emato critico (PCV), e dalla *ripetibilità* che si stima con misurazioni multiple della FEC.

**MATERIALI E METODI** - Nel biennio 2004 - 2006 e nel successivo 2006-2008 sono stati condotti due differenti studi rispettivamente in un gruppo di animali di razza Appenninica e in un gregge di razza Bergamasca. Nell'allevamento di razza Appenninica, sono state scelte 54 copie di madri figlie, per un totale di 108. Gli animali sono stati testati 4 volte nell'anno 2004 nell'arco di 9 mesi (febbraio, maggio, settembre e novembre 2004). La sperimentazione successiva è stata condotta su 114 pecore di razza Bergamasca (75 femmine adulte e 39 agnelle): dalle femmine adulte sono stati effettuati complessivamente sei prelievi individuali di feci, e precisamente tre nel 2007 (Maggio Agosto e Novembre), due nel 2008 (Aprile e Ottobre) ed uno nel 2009 (Febbraio). Le agnelle sono state campionate a partire dal mese di Agosto 2007. In ambedue le aziende, nei mesi antecedenti le prove e durante le stesse, gli animali non avevano ricevuto alcun trattamento antiparassitario. All'inizio dei prelievi l'età delle madri era compresa tra 4 e 6 anni, quella delle figlie fra i 20 e i 30 giorni.

In ogni campionamento da tutti i soggetti è stato prelevato un campione di feci in cui è stato valutato il parametro FEC (conta delle uova fecali) tramite la conta delle UPG (Uova Per Grammo), o OPG (Oocisti Per Grammo), utilizzando l'apparato FLOTAC® (Cringoli, 2006). Oltre ai Coccidi e agli Strongili gastrointestinali, compreso *Nematodirus* spp., i campioni sono stati analizzati per valutare la presenza di *Trichuris* spp., *Dicrocoelium dendriticum*, *Strongyloides* sp. e *Taenia*. Contemporaneamente al prelievo fecale è stato effettuato anche un prelievo ematico per la valutazione dei seguenti parametri: Basofili, Eosinofili, HCT, HGB, Linfociti, MCH, MCHC, MCV, Monociti, Neutrofili, PLT, RBC e WBC. I parametri ematologici sono stati determinati mediante l'uso di uno strumento ad impedenza (EMAT 8, SEAC). La conta dei linfociti, dei monociti, dei basofili, degli eosinofili e dei neutrofili è stata effettuata in seguito a colorazione dello striscio.

Per l'analisi statistica, i dati relativi alle OPG/UPG sono stati trasformati logaritmicamente secondo la formula  $y = \log(OPG/UPG + 25)$  (Baker, 1997), per correggere l'eterogeneità della varianza e per ottenere una distribuzione normale dei dati. La ripetibilità dei parametri è stata testata con il metodo delle correlazioni intra-classe utilizzando il seguente modello lineare misto per misure ripetute:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + e_{ijk}$  dove:  $Y_{ijk}$  = parametri considerati;  $\mu$  = media generale;  $\alpha_i$  = effetto casuale del soggetto  $i$ -esimo;  $\tau_j$  = effetto fisso del prelievo  $j$ -esimo ( $j = 1, \dots, 4$ );  $e_{ijk}$  = errore casuale.

Tutte le stime delle componenti della varianza per la ripetibilità sono state ottenute tramite procedura REML usando il metodo di Newton-Rapson (Patterson et al., 1974; Harville, 1977; Searle, 1971).

L'ereditabilità delle OPG ed UPG è stata ottenuta attraverso la regressione figlia-madre.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software JMP, ver. 5.0 per PC, del SAS Institute (2002).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Nella razza Appenninica il coefficiente di ereditabilità per le UPG riguardanti gli Strongili gastrointestinali è risultato pari a 0,11, valore tendenzialmente basso, ma in linea con i valori stimati su altre razze<sup>1,2</sup>. Per tutti gli altri parassiti l'ereditabilità è risultata nulla, molto probabilmente per il basso grado di infestazione rilevata nei soggetti analizzati. Non ereditabile è risultato anche il carattere PCV, in disaccordo con quanto riferito sulla razza ovina massese da Giulioti et al e da Benvenuti ed al. che riportano rispettivamente valori di 0.22 e 0.32. Per quanto concerne i coefficienti di ripetibilità dell'UPG per i diversi parassiti, il valore più alto si osserva per gli Strongili gastrointestinali (0.68) in linea con quanto riportato da altri autori<sup>1,3</sup>. Il valore di ripetibilità calcolato per il PCV è risultato pari a 0.47, indice di una buona incidenza dei fattori permanenti sulla variabilità totale. Valori elevati di ripetibilità sono stati riscontrati anche per i Coccidi (0.62<sup>4</sup>).

Poiché le specie parassitarie normalmente più diffuse e dannose (Strongili gastrointestinali e Coccidi) presentano valori dei coefficienti di ripetibilità e di ereditabilità elevati, i dati di questa sperimentazione fanno ipotizzare che la selezione genetica potrebbe essere utilizzata come metodo di controllo delle parassitosi nella razza Appenninica.

Le indagini parassitologiche effettuate nella sperimentazione condotta sul gregge di razza Bergamasca hanno reso possibile la stima dei parametri di ereditabilità e di ripetibilità solo per gli Strongili gastrointestinali e per i Coccidi<sup>5</sup>: in ambedue i casi tuttavia il basso grado di infestazione dei soggetti analizzati e l'elevata incidenza dei fattori temporanei sulla variabilità totale ha determinato un valore di tali coefficienti pari a zero. Dai dati raccolti ed elaborati in questa ricerca possiamo affermare in via preliminare che nella razza Bergamasca, a differenza di quanto osservato per la razza Appenninica, non è possibile al momento fare interventi di selezione per la resistenza genetica ai parassiti gastrointestinali.

## Genetic resistance to gastrointestinal parasites in two Italian sheep breeds

**Key words:** heritability, repeatability, genetic resistance.

## Bibliografia

- Benvenuti M.N., Cecchi F., Ciani D. (2003) - The genetic resistance to gastrointestinal parasites in Massese sheep breed: heritability and repeatability of faecal egg counts (FEC). EAAP 2003, Roma 31 Agosto - 3 Settembre, pag 87.
- Giulioti L., Benvenuti M.N., Goracci J., Verità P. (2005) - Observation on gastrointestinal strongylosis resistance in Zerasca breed. Proceeding of the ASPA 16th Congress, Torino, June 28-30, 373.
- Stear M.J., Mitchell S., Strain S., Bishop S. C., Mc Kellar Q. A. (2000) - The influence of age on the variation among sheep in susceptibility to natural nematode infection. Vet. Paras. 89: 31-36.
- Macchioni F., Cecchi F., Ciampolini R., Biagetti M., Ciani E., Filippini G., Papa P., Sebastiani C., Ciani D. (2007) - Parassitologia 49: 65-69.
- D'Avino N., Sebastiani C., Venditti G., Boto S., Filippini G., Ciampolini R., Macchioni F., Ciani E., Cecchi F. The genetic resistance to gastrointestinal parasites in Bergamasca sheep breed-XXVI Congresso SOIPA-Perugia 22-25 giugno 2010.



**Sessione  
Simposi Satellite**

## Clostridiosi e Mannheimiosi: dalle diversità anatomopatologiche alle affinità patogenetiche



F. ALOISIO

Institute of Animal Pathology, Vet-Suisse Faculty, Bern, Switzerland

Le infezioni da clostridi e “*Mannheimia*” (per questa presentazione vengono considerati in particolare le gastroenterossemie da *Clostridium perfringens* e infezioni da *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Bibersteinia trehalosii*) sono di estrema importanza nelle patologie dell'allevamento ovino e caprino.

Queste infezioni batteriche producono quadri anatomopatologici macroscopici diversi in quanto colpiscono primariamente l'apparato digerente nel caso delle clostridiosi e l'apparato respiratorio, nel caso delle mannheimiosi, con spesso coinvolgimento sistemico. Tuttavia se si considerano le lesioni microscopiche e si analizzano i meccanismi patogenetici delle due infezioni si possono osservare alcune similitudini.

*Clostridium perfringens* rappresenta il maggiore responsabile nella determinazione delle gastroenterossemie con una piccola eccezione caratterizzata dalle abomasiti prodotte da *C. septicum*. Nei piccoli ruminanti può colpire l'abomaso, piccolo e grande intestino, ed eventualmente altri organi in funzione del tossinotipo coinvolto. Le lesioni intestinali, quando presenti nella forma caratteristica, si manifestano come infiammazioni emorragiche e/o necrotizzanti con distribuzione variabile in funzione dell'organo e della specie colpita. Tra le altre lesioni che si possono apprezzare in associazione alle lesioni intestinali ci sono effusioni sierose in cavità toracica e pericardica, petecchie ed eventuali ecchimosi a livello epicardico and endocardico, precoce autolisi renale ed ecephalomalacia bilaterale simmetrica (ovini, *C. perfringens* tipo D, tossina epsilon). Le “mannheimiosi” producono prettamente un quadro broncopneumonico di varia gravità a seconda della specie batterica

coinvolta, con eventuale disseminazione sistemica. *Birbersteinia threalosi* costituisce una eccezione in quanto produce primariamente un quadro setticemico associato ad infiammazioni fibrino-necro-ulcerative con distribuzione embolica in diversi organi incluso il polmone. Le forme polmonari da *M. haemolytica* costituiscono le manifestazioni più gravi caratterizzate da broncopneumoniti fibrinose emorragiche, eventualmente necrotizzanti. Accanto alle forme polmonari, inoltre, può determinare gravi forme di mastite con caratteristiche morfologiche infiammatorie simili a quelle polmonari.

Ponendo l'attenzione sui meccanismi patogenetici nelle due infezioni si possono osservare similitudini a diversi livelli della malattia. In entrambe le infezioni sono necessari fattori predisponenti che innescano la colonizzazione dell'organo bersaglio. Infatti sia *C. perfringens* sia le principali pasteurellaceae patogene possono essere isolati dal contenuto intestinale, il primo, e dal nasofaringe, le seconde, in assenza di manifestazioni morbose. Sia nelle clostridiosi che nelle Mannheimiosi le lesioni tissutali più gravi sono dovute alla sintesi di esotossine. Queste tossine hanno differenti bersagli cellulari che spiegano le diverse manifestazioni patologiche nei siti di colonizzazione tissutale, rappresentati dalle strutture vascolari nel caso di *C. perfringens* e leucociti nel caso di *Mannheimia*. Tuttavia in entrambi i casi l'effetto patogeno delle esotossine si traduce, per via diretta o indiretta in un grave compromissione dell'interfaccia vasculo-tissutale responsabile delle lesioni edematose, fibrino-emorragiche e necrotizzanti osservabili macroscopicamente negli animali colpiti.



## Aspetti clino-diagnostici differenziali delle Clostridiosi e Pasteurellosi



**V. DI MARCO**

I.Z.S. Sicilia - Area di Barcellona P.G. (ME)

L'allevamento ovino risente ancora oggi di una gestione sanitaria improvvisata ed approssimativa che, in alcuni casi, connessa alla carenza di strumenti efficaci per combattere le numerose patologie di massa che lo affliggono, pregiudica in maniera determinante il reddito aziendale. Quanto sopra si verifica maggiormente in relazione alle patologie che si manifestano saltuariamente e con una evoluzione rapida, quali le clostridiosi e la pasteurellosi, i cui danni, dovuti alle caratteristiche biologiche della specie batterica ed in particolare alla sua patogenicità per gli ovini, difficilmente sono controllabili con la sola terapia medica. Le condizioni di campo non sempre favorevoli, la necessità di un invio tempestivo dei campioni e la non sempre ottimale capacità diagnostica

innovativa del laboratorio impediscono spesso di fare una diagnosi eziologica, e cosa parimenti importante, sierotipica e tossinotipica. Risultano infatti ampiamente carenti sia i dati clinici ed anatomo-patologici che i dati epidemiologici relativi alla presenza di queste due importanti patologie. Nella presente relazione, oltre a fornire un quadro eziopatogenetico e clinico-diagnostico-differenziale sulla pasteurellosi e sulle clostridiosi ovine in Italia vengono riportati i risultati di uno studio condotto sui diversi quadri clinico-patologici e sulla distribuzione dei relativi sierotipi di *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella trehalosi* (Thompson, et al., 1977; Odendaal e Henton, 1995) negli allevamenti ovini della regione Sicilia.

# La vaccinazione nella gestione della clostridiosi, della mannheimiosi e della pasteurellosi degli ovini



**L. ERMINI**

PM Ovini - Intervet Schering-Plough Animal Health

La Clostridiosi, la Mannheimiosi e la Pasteurellosi sono malattie la cui comparsa presuppone l'intervento di diversi fattori ambientali predisponenti:

- Variazioni climatiche.
- Infezioni virali.
- Infezioni parassitarie.
- Brusche variazioni del regime alimentare.
- Eccessi alimentari (di amidi, di proteine, ecc.).
- Carenze (di fibra, ecc.).

I trattamenti antibiotici eseguiti su tutto o parte del gregge alla comparsa dei primi casi clinici, assumono scarso significato e talora sono inutili.

Appare chiaro come, per affrontare queste patologie, i metodi di controllo più appropriati siano rappresentati dall'adozione di misure di profilassi diretta (interventi sull'ambiente, sull'alimentazione, sul management, ecc.) e indiretta (vaccinazione, ecc.).

La profilassi vaccinale può essere considerata il miglior metodo di controllo per i seguenti motivi:

- La comparsa delle suddette malattie è di solito imprevedibile.
- L'evoluzione clinica è sempre molto rapida.
- I trattamenti terapeutici sono di scarsa efficacia, così come scarsi sono i risultati che si ottengono con la "metafilassi" nei soggetti non ancora colpiti dalla malattia.

Sino a qualche tempo fa l'unica arma di profilassi immunizzante di cui

si disponeva era data dai vaccini stabulogeni.

Nel caso delle Mannheimiosi/Pasteurellosi gli stabulogeni contenevano una gamma molto limitata di sierotipi con il grosso limite di indurre una risposta immunitaria di tipo umorale siero-specifica, di conseguenza limitata.

La realizzazione di **Heptavac P** attraverso l'innovativa **tecnologia IRP** ha permesso di superare i limiti dei vaccini tradizionali.

**Heptavac P** consente di ottenere la più ampia protezione crociata in virtù sia dei numerosi sierotipi presenti nel vaccino (9 diversi sierotipi di *M. haemolytica* e *P. trehalosi*) sia dell'innovativa tecnologia di produzione degli antigeni vaccinali.

Anche per le clostridiosi i nostri ricercatori hanno messo a punto un vaccino, **Bravoxin10**, che con l'inclusione dei 10 principali clostridi e con le ultime tecnologie produttive consente di avere un'efficacia notevole, una considerevole e duratura risposta immunitaria negli animali, senza dover ricorrere ad un dosaggio elevato e ad un adiuvante aggressivo che potrebbero comprometterne la sicurezza di impiego. Ciò si ottiene con un processo di ultrafiltrazione dei tossoidi che si purificano dalle proteine non utili, prodotte durante il processo di fermentazione dei batteri.

L'ultrafiltrazione degli antigeni clostridiali, insieme con un legame "intelligente" antigene/adiuvante, a base di alluminio, permettono la concentrazione degli antigeni in un volume molto ridotto. Infatti, la dose del **Bravoxin10** negli ovini è di 1 ml capo.

## Sviluppo scientifico, prove cliniche e produzione industriale di vaccini per ovini e bovini contro la Blue Tongue



**P. HUDELET**

Responsabile Ricerca e Sviluppo Merial SAS, 254 rue Marcel Mérieux, 69007 LIONE, Francia

L'epidemia causata dal virus della Febbre Catarrale degli ovini, comparso in Europa nel 1999, ha avuto un impatto drammatico sulla salute degli animali e sull'economia delle produzioni zootecniche.

All'inizio, in Europa non era disponibile alcun vaccino contro la Blue Tongue e negli stati colpiti si è stati costretti a utilizzare vaccini vivi attenuati prodotti al di fuori dell'Unione Europea.

Dal 2001, a fronte di una richiesta sempre più pressante, Merial si è impegnata nello sviluppo di una linea vaccinale in grado di soddisfare i requisiti europei di qualità, sicurezza ed efficacia.

Merial, utilizzando il concetto di piattaforma tecnologica, ha messo a frutto l'esperienza maturata con un altro virus della famiglia degli orbivirus, l'agente eziologico della peste equina, realizzando così uno sviluppo accelerato che ha reso disponibile, nel più breve tempo possibile, per le Autorità e i Servizi Sanitari dei vari stati, un vaccino inattivato contro la Blue Tongue.

Grazie a una autorizzazione di impiego temporaneo, al lancio del primo vaccino contro il sierotipo 2 hanno fatto seguito 6 vaccini, sempre inattivati, contro diversi sierotipi.

Contemporaneamente, la raccolta di ulteriori dati ha consentito di ottenere una registrazione europea centralizzata con l'immissione in commercio del vaccino BTPPUR AlSap® 8 nel 2009.

La qualità e le caratteristiche di questo vaccino sono state dimostrate su ovini e bovini: sicurezza, nessun effetto collaterale sulla riproduzione e l'allattamento, così come una completa efficacia clinica con prevenzione della viremia.

Recenti comunicazioni scientifiche hanno dimostrato la sicurezza e l'efficacia del vaccino anche sulle capre.

L'insieme di queste caratteristiche fanno di BTPPUR AlSap uno strumento chiave nel controllo della Febbre Catarrale degli ovini in Europa.

### ■ Merial European experience in developing and producing vaccines for sheep and cattle against Blue Tongue

®BTPPUR AlSap è un marchio di Merial.

## Esperienze di campo nella gestione clinica e nella profilassi vaccinale di focolai di BTV 8 negli ovini in Francia



**P. AUTEF**

Medico Veterinario, 16 rue des Rochettes, 87300 BELLAC, Francia

La Febbre Catarrale degli ovini causata dal BTV8 è apparsa all'inizio di agosto 2008 nella regione di Bellac dove i greggi di pecore e gli allevamenti di bovini sono a stretto contatto, tanto che i primi sintomi sono stati osservati contemporaneamente in entrambe le specie.

La sintomatologia osservata negli ovini si è presentata in fasi successive. All'inizio si è verificata una mortalità iperacuta di alcuni animali e la diagnosi è stata confermata dall'esame autotipico della cavità orale, dalla ricerca di placche emorragiche sull'arteria polmonare nonché dal contesto epidemiologico.

Successivamente è comparso un quadro clinico classico nel quale l'ipertermia era associata all'interessamento della mucosa orale, accompagnato da un esito incerto (guarigione di circa il 50% dei soggetti); a volte si è notato anche un interessamento podale con zoppia.

A distanza di qualche settimana o pochi mesi, alcuni soggetti hanno presentato un dimagrimento cronico con cachessia e morte.

Va sottolineato che la relativamente bassa incidenza di casi di aborto, agnelli nati morti e/o mortalità neonatale sia da porre in relazione al fatto che, all'apparizione del virus, la maggior parte delle pecore non era gravida.

Le difficoltà nella fornitura e nell'approvvigionamento di vaccini contro il BTV8 ha in un primo tempo reso prioritaria la vaccinazione mirata sui bovini, i cosiddetti broutard, poiché, in assenza di vaccinazione, viveva il blocco delle esportazioni di questa tipologia di animali verso l'Italia.

Successivamente è stata realizzata la vaccinazione delle mandrie di riproduttori bovini, a partire dal mese di giugno, e poi quella degli ovini, dall'inizio di luglio. La realizzazione della vaccinazione, in particolare degli ovini, si è scontrata con numerose difficoltà materiali: forti pressioni da parte degli allevatori che richiedevano che i loro animali fossero tra i primi a essere protetti dalla vaccinazione che avveniva in un contesto di scarsa disponibilità di dosi di vaccino, carenze di personale, incertezze sull'impiego dei vaccini (sicurezza, efficacia...).

A queste difficoltà si è aggiunto il fatto che la vaccinazione è stata iniziata su gran parte dei greggi di pecore in concomitanza con l'arrivo del fronte della malattia; è stato quindi necessario spiegare agli allevatori che i sintomi osservati pochi giorni dopo la vaccinazione erano causati dall'arrivo della malattia e che non si trattava di reazioni post-vaccinali.

Empiricamente, in questo contesto di progressione della malattia, abbiamo notato che la "protezione" del bestiame poteva essere considerata efficace circa due settimane dopo la somministrazione del vaccino contro il BTV8.

La campagna vaccinale contro il BTV8 degli ovini è stata realizzata da luglio a novembre 2008 e sono state vaccinate circa 85.000 pecore e agnelli in circa il 90% degli allevamenti ovini della nostra regione; sono state segnalate scarse reazioni locali con l'eccezione di qualche zoppia localizzata agli arti anteriori nei giorni successivi alla vaccinazione. Non sono state riportate reazioni infiammatorie, né infezioni secondarie, né reazioni anafilattiche.

Questi dati vanno contestualizzati, considerando il differente approccio

degli allevatori di ovini rispetto a quello di bovini; gli allevatori di ovini tendono a segnalare solo gli effetti collaterali che interessano un vasto gruppo di animali, a differenza di quelli di bovini nei quali le reazioni indesiderate sono segnalate con maggiore attenzione.

Numerose sono state le domande riguardanti i possibili effetti collaterali della vaccinazione sulla gestazione, sull'impianto degli embrioni e sulla fertilità in generale.

In effetti, il periodo di accoppiamento classico nelle nostre razze tradizionali di pecore è da settembre a novembre, lo stesso periodo nel quale è stata praticata la vaccinazione.

Analogamente, siamo stati interpellati sulle vaccinazioni effettuate nel mese di luglio nelle pecore che erano state fecondate fuori stagione, 2-3 settimane prima.

Anche in questo contesto non è stato osservato alcun effetto collaterale. La vaccinazione delle pecore nelle ultime sei settimane di gestazione non ha causato un numero superiore di aborti rispetto a quello causato da un vaccino diverso somministrato in questa stessa fase; queste reazioni sono comparse sporadicamente e sono state attribuite a un contenimento degli animali troppo energico.

La fase finale della gestazione è per gli ovini un periodo fortemente a rischio; questa specie è, infatti, molto sensibile a qualsiasi tipo di stress o di cambiamento, quali il rientro all'ovile, gli stress termici, gli improvvisi cambi di alimentazione. In questo contesto, la vaccinazione può essere il fattore scatenante una patologia infettiva, metabolica, ecc.

Negli arieti infettati dal BTV8 nell'estate del 2008 è stata segnalata una infertilità più o meno prolungata e, talvolta, essendo la monta avvenuta qualche settimana dopo l'infezione, è stata, a torto, considerata come un effetto secondario della vaccinazione.

In conclusione, l'esperienza di tre campagne vaccinali contro il BTV8 degli ovini (circa 80.000 a stagione) ci consente di suggerire alcune raccomandazioni pratiche. La tolleranza locale del vaccino è molto buona, l'iniezione sottocutanea, tuttavia, deve essere effettuata nella regione laterale del collo, infatti, l'inoculazione intrascapolare, se accompagnata da un lieve sanguinamento, può provocare, nella stagione favorevole, una miasi da *Lucilia sericata*. Per quanto riguarda la fase finale della gestazione, se le pecore sono contenute con calma (corridoi, parchetti di sosta, recinti stretti...), non si è verificata alcuna conseguenza abortiva.

In merito agli accoppiamenti, in particolare quelli fuori stagione, la nostra esperienza ci ha indotto a evitare la vaccinazione nel periodo compreso tra l'inserimento della prima spugnetta vaginale e le quattro settimane successive alla fecondazione, periodo di impianto del feto (questa precauzione è da ritenersi valida per qualsiasi intervento vaccinale!). Per prevenire problemi di fertilità negli arieti, conseguenti alla possibile reazione febbrile post-vaccinale, suggeriamo di evitare la vaccinazione durante il mese che precede il periodo di attività.

■ **Field experience of BTV8 in sheep in France: clinical aspects, veterinary management and prophylaxis approach**



# Implicazioni epidemiologiche e zootecniche del *periparturient egg rise* nell'allevamento ovino



M.T. MANFREDI

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** parassiti, nematodi gastrointestinali, pecora, *periparturient egg rise*.

Le malattie parassitarie e le infestazioni da nematodi gastrointestinali (NGI) in particolare, costituiscono una presenza costante negli allevamenti dei piccoli ruminanti e sono responsabili di riduzione delle produzioni con perdite valutate fino al 20%. Tuttavia la loro presenza è comunemente sottovalutata anche in considerazione della mancanza di una sintomatologia clinica caratteristica ed eclatante. La situazione epidemiologica italiana, relativamente alle parassitosi ovine, è scarsamente aggiornata; una recente revisione illustra una presenza importante dei protozoi del genere *Eimeria*, dei NGI, dei nematodi broncopulmonari (protostrongilidi e *Dyctiocaulus*) e di *Dicrocoelium dendriticum* nelle greggi ovine allevate in Italia (Garippa et al. 2008). Tra gli endoparassiti, i NGI svolgono un ruolo non trascurabile come testimoniano sia gli elevati valori di prevalenza sia la numerosità delle specie parassitarie coinvolte nelle infestazioni. Il livello di parassitismo si mantiene elevato anche nelle aziende in cui la gestione appare ottimale ed è essenzialmente riconducibile alle peculiarità dell'allevamento ovino che si basa sullo sfruttamento del pascolo in tutte le regioni italiane. Il pascolo, rappresenta, infatti, il principale fattore di rischio per l'acquisizione della maggior parte delle specie parassitarie che colpiscono gli ovini. I NGI delle pecore hanno una grande diffusione in virtù delle peculiarità del loro ciclo biologico (periodo di prepatenza molto breve, larve infestanti molto resistenti nell'ambiente...) e delle strategie adottate dal parassita per perpetuarsi nella popolazione ospite. Nella popolazione adulta, i NGI, infatti, hanno una distribuzione sovradispersa caratterizzata dalla presenza di pochi parassiti in un elevato numero di ospiti e dalla massiccia presenza di NGI in uno scarso numero di ospiti, circa il 20% degli infestati. Tali soggetti eliminano un grande numero di uova e quindi garantiscono la sopravvivenza di una numerosa progenie del parassita. La distribuzione dei NGI nella popolazione ospite è per altro influenzata dall'età, dal sesso e dallo stato fisiologico dell'ospite. In particolare, la riduzione dell'immunità acquisita nei confronti di tali nematodi in prossimità del parto e le conseguenze sull'epidemiologia delle infestazioni è ben documentata nella pecora (Armour 1980; Michel 1976; Barger 1993; Gibbs 1986). Tale alterazione nella risposta immunitaria provoca un aumento delle uova escrete nelle feci nel periodo compreso tra 2 settimane prima del parto a 8 settimane dopo il parto (*periparturient egg rise*-PPER). La diminuzione di efficienza della risposta immunitaria è temporanea e sembra essere dovuto alle modificazioni della concentrazione nel sangue della prolattina in prossimità del parto. La risposta immunitaria si ristabilisce rapidamente quando i livelli dell'ormone cadono, alla fine del periodo di lattazione o nei casi in cui gli agnelli siano svezzati precocemente. L'aumento delle uova prodotte in questo periodo può essere conseguente ad un aumento della popolazione di parassiti per maturazione di larve ipobiotiche a seguito della riduzione della risposta immunitaria dell'ospite o per aumentata capacità delle larve infestanti di insediarsi nell'ospite. Inoltre, grazie alla diminuita efficienza della risposta immunitaria i parassiti già presenti nell'ospite manifestano un aumento della fecondità.

Attualmente, si ritiene che la riduzione dell'efficienza immunitaria nei confronti dei parassiti nel periodo del periparto sia in gran parte dovuta a fattori nutrizionali, e nello specifico all'aumento delle richieste nu-

tritive alla fine della gravidanza o durante la lattazione quando non vengono adeguatamente soddisfatte da una corretta supplementazione alimentare. Per altro, è stato dimostrato che, se le esigenze nutrizionali sono minori come nelle capre o nelle pecore con gravidanze monofetali, il grado di PPER è meno elevato rispetto a quello che si può rilevare nei soggetti con gravidanze gemellari. Infatti, la carica di parassiti e anche l'escrezione di uova nelle pecore con gravidanze monofetali risultano inferiori. Infine, appare evidente che le differenze in PPER osservate in pecore di razze diverse potrebbero essere legate al differente potenziale produttivo e quindi alle diverse esigenze nutrizionali piuttosto che a fenomeni di resistenza legati al patrimonio genetico di una razza (Houdijk, 2008).

Il PPER ha importanti ripercussioni relativamente all'epidemiologia del parassita; l'elevata escrezione di uova da parte delle pecore adulte coincidente con il periodo dei parti comporta da un lato l'infestazione degli animali giovani che consentono al parassita di riprodursi più facilmente. Un'ulteriore conseguenza, non trascurabile, è l'aumento del livello di contaminazione ambientale in un momento in cui le condizioni climatiche dei pascoli sono favorevoli allo sviluppo e alla sopravvivenza larvale. Sul piano delle implicazioni zootecniche, sia negli agnelli nel corso della fase iniziale di acquisizione di immunità sia nelle pecore durante il periodo del periparto, l'infestazione a carico dell'abomaso o del piccolo intestino induce una carenza proteica indotta dalla ridotta assunzione di alimenti conseguente alla depressione dell'appetito che è reversibile se gli animali ricevono un adeguato supplemento proteico (Sykes e Greer, 2003). Appare evidente da queste asserzioni, l'importanza di monitorare l'escrezione di uova dei parassiti negli ovini infestati e soprattutto considerare il fenomeno del PPER nei programmi di controllo dei NGI delle pecore. Ciò consentirebbe di effettuare interventi mirati, efficaci e nel contempo di applicare un programma di controllo rispettoso della sicurezza ambientale e in cui i rischi di farmaco-resistenza siano ridotti.

## ■ Epidemiological and zootechnical effects of *periparturient egg rise* in sheep

**Key words:** parasite, gastrointestinal nematodes, sheep, *periparturient egg rise*.

## Bibliografia

- Armour J. (1980), *Vet Parasitol* 6: 7-46.
- Barger I.A., (1993), *Int J Parasitol* 23: 463-469.
- Garippa G., Bufano G., Caroli A., Carta A., Cringoli G., De Nardo F., Filipini G., Leori S.G., Moniello G., Ronchi B. (2008), *Large Animal Review*, 14 suppl 4: 40-43.
- Gibbs H.C. (1986), *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2: 345-353.
- Houdijk J.G.M. (2008), *Parasite Immunology*, 30 (2): 113-121.
- Jeffcoate I.A., Fishwick G., Bairden K., Armour J., Holmes P.H. (1990), *Res Vet Sci* 48: 295-300.
- Michel J.F. (1976), *Adv Parasitol* 14: 355-397.
- Sykes A.R., Greer A.W. (2003), *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43, 12:1393-1398.
- Wildeus S., Zajac A.M. (2007), *Journal of Animal Science*, Suppl. 2 85: 36-36.

## Peri Partum Rise: le soluzioni Pfizer



### A. SORIOLO

National Veterinary Manager Pfizer Italia

Durante il periparto, assistiamo all'aumento dell'eliminazione di uova di parassiti gastrointestinali da parte delle pecore. Questo evento si manifesta a partire dalle 2-3 settimane prima del parto e si protrae per le 6-8 settimane dopo il parto. Il fenomeno è condizionato da vari fattori:

- genetici
- endocrini
- immunologici
- alimentari.

Il controllo dei parassiti gastrointestinali nel periodo del periparto consente un aumento della produzione di latte ed un maggiore incremento ponderale degli agnelli.

Pfizer, grazie alla sua gamma di prodotti antiparassitari, in particolare Cydectin soluzione orale 0,1%, è in grado di offrire al Veterinario strumenti efficaci per il controllo dei parassiti durante il periodo del periparto.

# Biology of *Coxiella burnetii* and host response to infection



A. RODOLAKIS, D. COCHONNEAU

INRA UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique F37380 Nouzilly France

*Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, a worldwide zoonosis, is considered as a highly efficient pathogen because the estimate of its infectivity for humans ranges from 1 to 10 organisms (Tigertt et al., 1961), even if most of these infections are asymptomatic. *C. burnetii* is extensively distributed in nature and able to infect many animal species including mammals, birds, reptiles and arthropods. (Maurin and Raoult, 1999). As in humans, *C. burnetii*'s infection in animals is frequently subclinical, but in mammals, it may cause reproductive disorders like abortions and stillbirths. Metritis and infertility are frequently the main clinical signs of infection in cattle herds. Infected livestock, especially goats, sheep and cattle are considered as the main reservoir for human Q fever, as they shed a huge number of bacteria in placenta and birth fluid after abortion or parturition. They also excreted smaller numbers of the organism in vaginal mucus, urine, faeces and milk but this shedding may persist over several months (Guatteo et al., 2006; To et al., 1995).

As inhalation of infectious aerosol or airborne dust is the most common mode of transmission of the disease from animals to human or to other animals, the spreading in fields of manure from infected herds may be an important source of contamination because the wind may propagate the disease over large distances.

In addition cats and dogs can be a source for human infection (Buhariwalla et al., 1996; Komiya et al., 2003; Langley et al., 1988) especially if they ingest infected placentas and fetuses.

**1. BACTERIOLOGY** - *C. burnetii* is a small gram-negative intracellular pleomorphic coccobacillus (0.2 to 0.4 µm wide and 0.4 to 1 µm long). Historically the bacterium belonged to the order *Rickettsiales*, however the gene sequence analysis of the complete genome of *C. burnetii* Nine Mile classifies the *Coxiella* genus in the order *Legionellales*, family *Coxiellaceae* with the genera *Rickettsiella* and *Aquicella* (Seshadri et al., 2003).

*C. burnetii* multiplies by transverse binary fission through a developmental cycle presenting superficial similarities with that of *Chlamydia* (Heinzen et al., 1999).

**1.1 Developmental Cycle (Fig. 1)** - The intracellular developmental cycle of *C. burnetii* involves three morphological and functionally distinct cell types: large cell variants (LCVs), small-cell variants (SCVs) and small dense cells (SDCs). The LCVs, as the reticulate bodies of *Chlamydia*, are the osmotically sensible intracellular forms that

which are metabolically active. The SCVs and SDCs, which are the extracellular forms of the bacteria, resistant to osmotic pressure, are morphologically identical, but they could be separated by their sensitivity (SCVs) or resistance (SDCs) to French pressure treatment at 20 000 psi (Samuel et al., 2003).

The SCVs and SDCs enter into the eukaryotic cells by microfilament-dependent parasite directed endocytosis (Baca and Paretsky, 1983). Around 2 hours after internalization the *Coxiella* containing phagosome fuses with lysosomes that which acidify the vacuole. *C. burnetii* has an absolute requirement of this acidic pH (4.8) to activate metabolism (Heinzen et al., 1999) and allow the differentiation of SCV to LCV, a process that which takes 1-2 days to occur. LCV forms predominated over the next 4 days, during which exponential growth is observed. Stationary phase starts at approximately 6 days after the entrance into the host cell and coincides with the reappearance of SCV, due to a LCV-to-SCV condensation, similar to the chlamydial reticulate body, to elementary body differentiation. The SCVs increase in number at 8 days after the entry into the host cell (Coleman et al., 2004).

The morphological differences between the LCVs, SCVs, and SDCs, correlate with different protein composition. In particular, the major outer membrane protein P1, that which functions as a porin, is absent in SDCs (McCaul et al., 1991), that and is responsible of for the environmental stability of *C. burnetii*. Since *C. burnetii* is very resistant, highly infectious and transmissible by aerosol, hardly little affected by extreme environmental conditions, it is classified as a category B biological weapon.

**1.2 Survival** - *C. burnetii* is able to survive in an extra cellular environment. Survival of *C. burnetii* for long periods in contaminated foods, buildings and pastures has resulted in human and animal infections (Babudieri, 1959; Schulz et al., 2005; Stein and Raoult, 1999; Tissot-Dupont, 2009; Yanase et al., 1998).

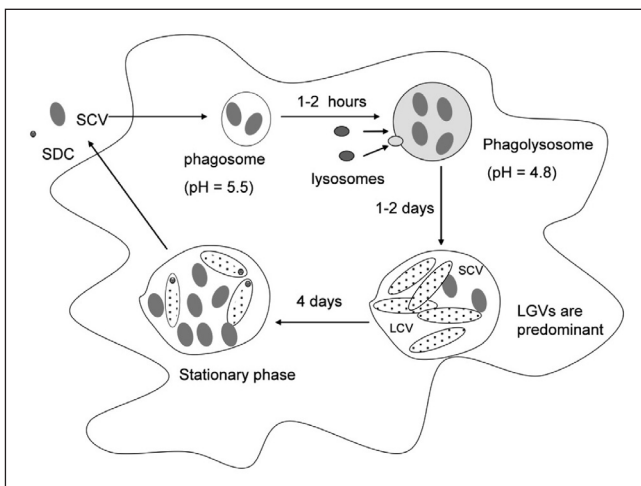
The microorganism is resistant to outdoor conditions (elevated temperature, ultraviolet light, osmotic, shock and desiccation). For example, *C. burnetii* can survive at 20-22°C during more than 5 months in water, more than 6 months in 10% salt solution (9 months at 4°C), 6 months in dried guinea pig blood, 48 months in ticks feces, (Williams, 1991).

*C. burnetii* is also resistant to chemical disinfectants. Formaldehyde gas failed to consistently inactivate  $10^5$  *C. burnetii* in a large room without humidity control, while seeded *C. burnetii*, seeded onto membrane filters in a small sealed chamber, are inactivated by overnight exposition to humidified formaldehyde gas or ethylene oxide (Scott and Williams, 1990). Liquid suspension of  $10^8$  *C. burnetii* is inactivated in 30 min in 70% ethyl alcohol or 5% chloroform or 5% of Enviro-Chem (Chem Sales Ellicott City MD USA), a mixture of 2.25% N-alkyl dimethyl benzyl, 2.25% ethylbenzal and ammonium chlorides (Scott and Williams, 1990). The treatment of slurry by calcium cyanamid 0.6% during one week allows the inactivation of *C. burnetii* (Arricau-Bouvery et al., 2001).

*C. burnetii* may also persist in the environment due to ticks, that which are considered to be the natural primary reservoirs of *C. burnetii*, and are responsible for the spread of the infection in wild animals and for the transmission of *C. burnetii* from wild to domestic animals. Ticks transmit *C. burnetii* vertically to their progeny and horizontally to wild animals especially rodents and sometimes ruminants. *C. burnetii* was identified in more than 40 tick species of 12 genera. The feces of ticks infected with *C. burnetii* have very high concentrations of viable organisms which may persist for long periods (at least 586 days) in the environment (Kazar, 2005).

In addition *C. burnetii* could survive in free-living amoebae (Moliner et al., 2009).

**1.3. Phase variation** - *C. burnetii* has a cell wall similar to that of Gram-negative bacteria. When it is propagated on cell culture or em-



**Figure 1** - Intracellular developmental cycle of *C. burnetii* in the eukaryotic cells.

bryonated hen's eggs, its outer membrane varies after several passages. This variation, called phase variation, is similar to the smooth to rough lipopolysaccharide (LPS) transition of Enterobacteriaceae (Baca and Paretsky, 1983). *Coxiella* expressing a complete LPS (phase I bacteria) are virulent and isolated from infected hosts. They resist to complement-mediated serum killing contrary to avirulent phase II *C. burnetii* which presented a truncated form of LPS that lacks the O-polysaccharide chain, characteristic of "phase I" LPS (Toman and Skultety, 1996).

**1.4 Virulence factors** - The knowledge of the virulence determinants of *C. burnetii* has been hampered by the lack of methods for genetic manipulation, as well as accurate methods for assessing the virulence of the strains. However the ability of *C. burnetii* to grow in a usually bactericidal environment is likely a crucial virulence factor. *C. burnetii* is the only known bacterium that replicates into a phagolysosome that which is undistinguishable from a secondary lysosome (Voth and Heinzen, 2007). Full-length LPS is the only defined virulence factor of *C. burnetii* (Moos and Hackstadt, 1987). The comparison of the whole-genome sequence of two strains isolated from human endocarditis with those of *C. burnetii* Nine Mile, supposed to be representative of human acute disease isolates, and *C. burnetii* Dugway, considered as less virulent than the others (Seshadri and Samuel, 2005), revealed disparate collection of pseudogenes that which may contribute to virulence isolation virulence (Beare et al., 2009b), but their role needs to be confirmed.

**1.5 Typing** - Although only one serotype has been described for *C. burnetii*, antigenic and genetic differences between strains have been reported. These studies were mainly undertaken to distinguish the strains inducing acute Q fever from those leading to chronic forms of the disease in humans. Thus, using SDS PAGE and immunoblotting on LPS (Hackstadt, 1986; Hotta et al., 2003; To et al., 1998a; To et al., 1995) or outer membrane proteins (To et al., 1998b), strains can be classified into groups containing almost exclusively isolates from human cases of chronic Q fever different from those including strains from milk, ticks or from human cases of acute Q fever.

Depending on plasmid types (Samuel et al., 1985) or DNA restriction fingerprints (Hendrix et al., 1991), two groups of chronic disease isolates bearing QpRS plasmid or plasmid related sequences integrated into chromosome could be distinguished, each having unique restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of chromosomal DNA. Three similar but distinct RFLP patterns were seen among the group of acute disease isolates that bear QpH1 plasmid. Three additional isolates included in this study exhibited a unique RFLP pattern and also had a unique plasmid type, designated QpDG. These results were in agreement with those of Nguyen and Hirai (Nguyen and Hirai, 1999) who classed 19 isolates from various geographic origins in 3 groups, according to the sequence of the isocitrate dehydrogenase (*icd*) gene of *Coxiella burnetii* Group 1 contained isolates originating from acute cases of Q fever, ticks and cows. Groups 2 and 3 included isolates from chronic Q fever patients and a prototype strain from an aborted goat. Similar results were obtained with the gene *com1* on 21 strains (Zhang et al., 1997). Glazunova et al (Glazunova et al., 2005) attempted to correlate multispacer sequence typing (MST) with the ability of strains to induce chronic infection in human. MST yielded 30 different allelic combinations (sequence type or ST) from 173 strains from different geographical and host origin, but the hosts were not described contrarily to the geographical origin. The phylogenetic analysis showed 3 major clusters: the cluster 1 corresponded to plasmid QpRS and QpDV and to group II and III of *com1* RFLP typing. The strains bearing plasmid QpH1 were classed in the clusters II and III, the cluster II corresponded to group I and V of *com1* RFLP typing, and the cluster III to group I and VI. The authors found one ST, ST8, specific of chronic disease and four ST, ST1, ST4, ST16 and ST18 specific of acute disease.

But the relationship between molecular typing and pathotype is still controversial. QpH1 plasmid was found in isolates from chronic Q fever patient (Stein and Raoult, 1993; Thiele and Willems, 1994) and isolates without the QpH1 plasmid were able to cause acute disease (Stein and Raoult, 1993). In addition pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and RFLP patterns of 80 *Coxiella burnetii* isolates derived from animals and humans in Europe, USA, Africa and Asia allow the distinction of twenty different groups that corresponded to the geographical origin of the isolates but no correlation between restriction groups and virulence of isolates was detected (Jager et al., 1998).

Multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA) was used by two teams to classified sixteen isolates mainly from ticks (8 isolates) or human (5 isolates) origin (Svraka et al., 2006) and forty two

isolates mainly from ruminants (32 isolates) (Arricau-Bouvery et al., 2006). MLVA allows the identification of 36 different genotypes among the 42 isolates that which match well with the plasmid groups. The MLVA clustering is in agreement with MST data (Glazunova et al., 2005), but the major interests of the two typing methods are that they are easily reproducible and provide useful tools for epidemiological studies (Chmielewski et al., 2009). In addition they could be used on DNA extracted from clinical samples without needing of strain isolation in order to find the source of human contamination (Klaassen et al., 2009) or to study the circulation of *C. burnetii* inter or intra herds (Dusquesne et al., 2007) allowing to identify the major strains present in an area. Thus the sequencing of the pseudo gene Cox 18 of 23 vaginal samples from 3 caprine herds and one ovine flock from the south east of France (Dusquesne et al., 2007) showed that only 2/9 alleles described for Cox18 (Glazunova et al., 2005) were present in small ruminants from this part of France with one predominant allele found in 21/23 animals. But it also established that 2 strains may be present in the same flock and in the same animal too. Such results could mean that an animal infected by one strain could be surinfected by another strain. However we demonstrated in mice that a primo-infection by one strain induces an efficient immunity and protects against a virulent challenge by another strain even with a very high dose. So the only way to find two strains in the same animal, except a laboratory artifact, seems to be a co-infection by the 2 strains at the same moment (unpublished data).

**2. IMMUNOLOGY** - Phase I *C. burnetii* are able to infect mononuclear phagocytes that which appear to be unable to control bacterial growth in naïve animals.

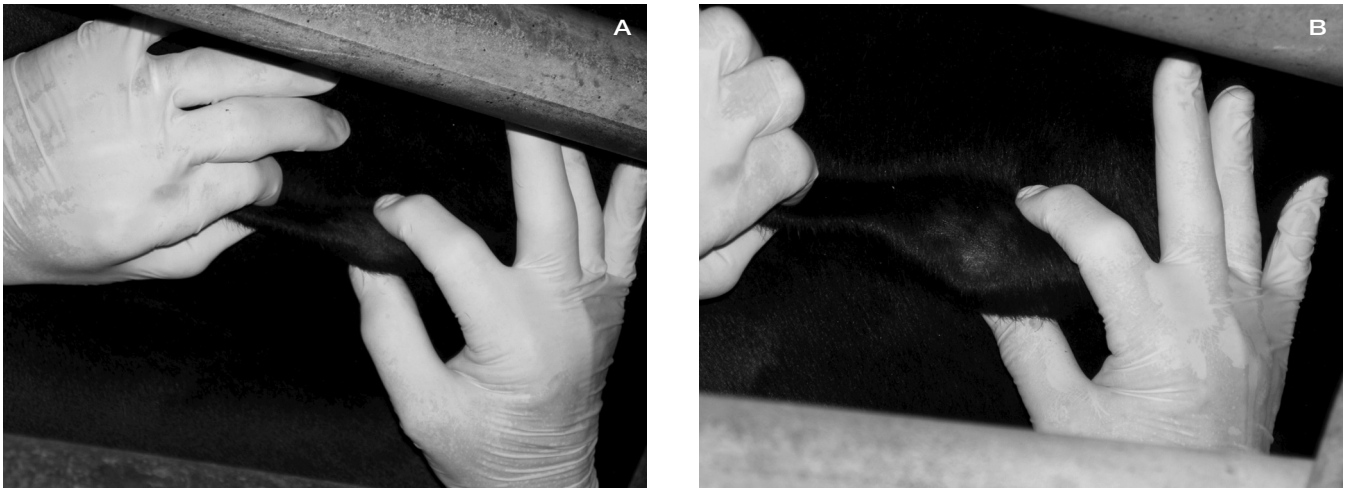
**2.1 Humoral immunity** - The role of antibodies has been overlooked a long time and is still controversial but as early as in the forties, Burnet and Freeman have described the passive protection of mice and guinea pigs with *C. burnetii* antiserum (Shannon and Heinzen, 2008). In addition specific antibodies accelerate the clearance of the bacteria, but the precise mechanism by which they contribute to immunity have not been determined (Shannon and Heinzen, 2008).

Infection and vaccination with *C. burnetii* in animals and humans induced significant antibody responses against *C. burnetii* antigens (Behymer et al., 1976; Berri et al., 2002; Guigno et al., 1992). The antibody response becomes detectable by ELISA 2 to 3 weeks after infection as observed in experimental infection of cows (Plommet et al., 1973) or pregnant goats (Arricau Bouvery et al., 2003). The antibody titre gradually increased up during 3 to 4 months. It remained positive during 15 months in the majority of the experimentally infected cows. In naturally infected animals these antibodies may persist several years without reproductive disorders or shedding (Berri et al., 2002), while other animals remained seronegative and excrete *Coxiella*. This seronegative response of infected animals shedding *C. burnetii* was observed in an experimental infection, since one goat that aborted after being inoculated with the higher dose ( $10^8$  *Coxiella*) did not become seropositive (Arricau Bouvery et al., 2003), and also frequently in naturally infected flocks (Berri et al., 2001; Rodolakis et al., 2007a; Rousset et al., 2007). For example, during a 2 years survey of a group of 34 naturally infected ewes, the 2 ewes that shed *C. burnetii* for the longer period of time remained seronegative (Berri et al., 2001; Berri et al., 2002). This could indicate that these ewes failed to develop a humoral response against the bacteria, but we have demonstrated that it is only due to the antigen used in the ELISA kit, as the *C. burnetii* Nine Mile strain, isolated from a tick in 1935 (Davis and Cox, 1938) present shows antigenic variations when compared to strains isolated from ruminants and detects less positive sera by microimmunofluorescence than 3 *C. burnetii* strains isolated from ovine and caprine (Rodolakis et al., 2007b).

The first antibodies produced are directed against phase II LPS, and in humans high levels of anti-phase I IgG are found in patient with chronic Q fever, while patients with acute Q fever present only antibodies anti-phase II (Maurin and Raoult, 1999). In ruminants chronic Q fever or persistent infections are poorly defined in animals and the eventual difference of antibody response between acute or chronic infection has to be investigated.

**2.2 Cell mediated immunity** - Cell-mediated immunity (CMI) seems crucial for the elimination of the agent. This immune response interferes locally by granuloma formation but also by a systemic response which manifests itself by the activation of monocytes and macrophages by interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) resulting in the production of reactive nitrogen and oxygen intermediates leading to intracellular killing of *C. burnetii* (Waag, 2007).





**Figure 2** - Skin test on vaccinated cows 72 h after intradermal inoculation in the neck of 0.1 mL of the vaccine Coxevax (CEVA Sante Animale France) diluted 1/3. The ST was considered as positive when a nodular area > 1cm was observed. (A). The result is expressed by a score 0-4 score A = 1, B = 4.

In pregnant goats experimentally inoculated, a strong maternal T-cell response was detected in the inter-placentomal areas, but not in the placentomes where only neutrophils and some macrophages were associated with the lesions (Sanchez et al., 2006).

Suppression of CMI in mice by corticosteroid treatment, pregnancy or by gamma irradiation induces reactivation of persistent *C. burnetii* infection (Sidwell and Gebhardt, 1966; Sidwell et al., 1964a, b) proving the extent of the cellular immunity in the control of *C. burnetii* infection.

The role of the CMI in the protection and vaccination was mainly studied in mice. The transfer of splenocytes from phase I vaccinated mice into naive mice protects them against a virulent challenge indicating that CMI plays an important role in the protective immunity elicited by vaccination (Zhang et al., 2007).

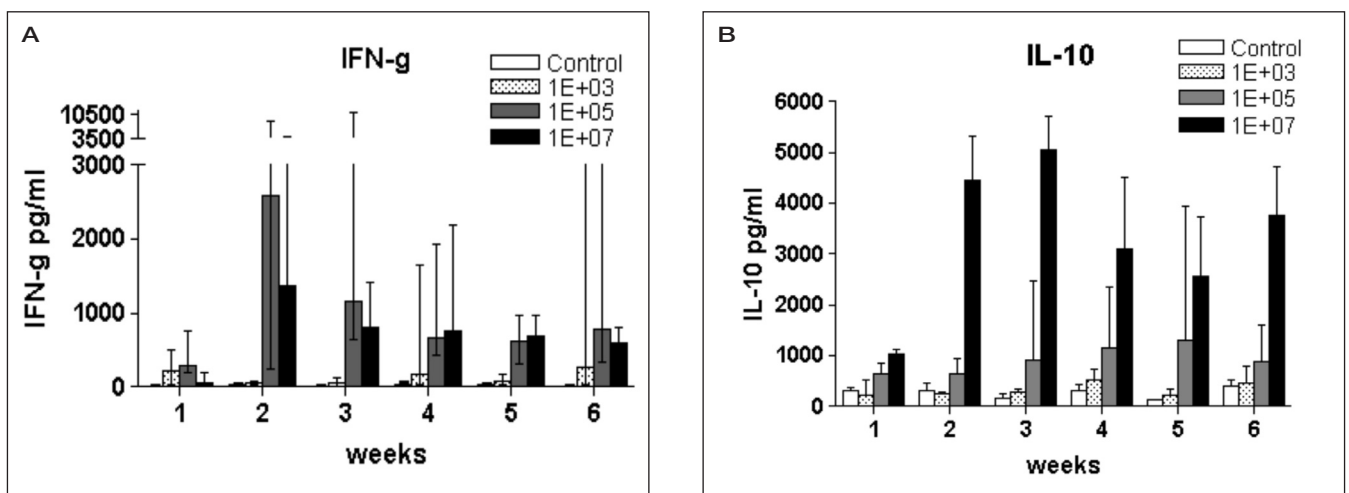
**2.2.1 Assessment of the cellular immunity in ruminants.** Most of the studies on CMI were performed on mouse models or on human samples, due to the availability of specific immunological reagents. However the cellular immune response of ruminants can be easily checked by using a skin test (ST) (Fig. 2) or by whole-blood INF- $\gamma$  assay.

The level of INF- $\gamma$  in blood could be assessed by ELISA after 48 to 72 h of incubation at 37°C of 1 mL of heparinized blood with 0.1 mL of vaccine Coxevax (unpublished data).

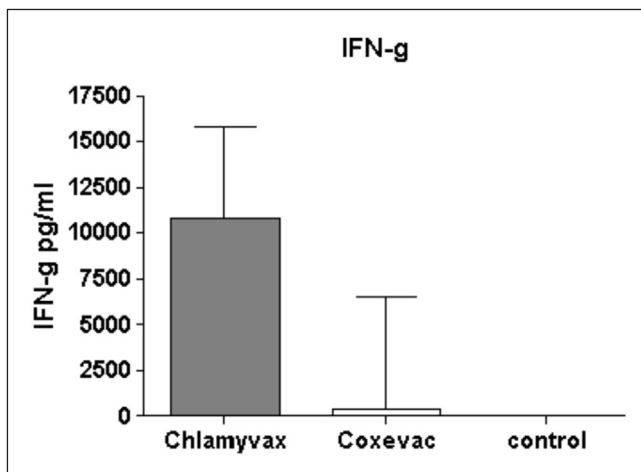
**3. IMMUNOPATHOLOGY** - In contrast to INF- $\gamma$ , IL-10, promotes the multiplication of *C. burnetii* in human monocytes (Honstetter et al., 2003) and IL-10 overproduction is associated in patients with the development of chronic Q fever (Honstetter et al., 2003). IL-10 is a pleio-

tropic cytokine exhibiting both pro and anti-inflammatory properties, maintaining the balance between immunity to pathogens and pathology that which could result of in uncontrolled immune response (Shannon and Heinzen, 2008). The modulation of the immune response INF- $\gamma$ /IL 10 could be related to the host, the *C. burnetii* strain, but also to the dose of *Coxiella*.

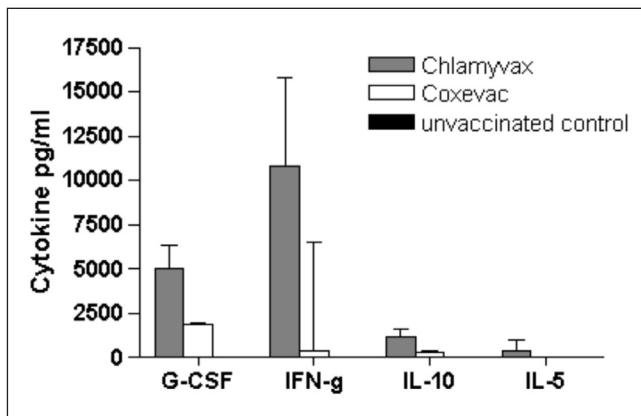
Risk factors of the hosts, such as heart valve abnormalities, pregnancy or immunosuppression are well documented (Maurin and Raoult, 1999) contrary to the factors linked to the strain as shown by the controversies around the genotype/pathotype correlation. Russell-Lodrigue et al (Russell-Lodrigue et al., 2009) compared the responses of immunocompetent and immunocompromised mice and guinea pigs to the inoculation of 8 *C. burnetii* strains belonging to 4 genomic groups, two of which supposed associated with chronic disease. They showed differences of virulence and of levels of cytokines production according to the genomic group, but failed to demonstrate that some strains induce a lower level of INF- $\gamma$  associated with an overproduction of IL-10 characteristic of a chronic evolution. In contrast we revealed the incidence of the dose of *Coxiella* on the Th1/Th2 response of mice. Indeed mice inoculated with  $10^5$  *C. burnetii* CbC1 developed an efficient immune response with a weak level of IL10 and a high level of INF- $\gamma$  that which reached a peak after 2 weeks. In contrast, the mice inoculated with  $10^7$  *C. burnetii* CbC1 produced a low level of INF- $\gamma$  and a very high level of IL-10 that which could evoke an evolution towards a chronic disease (Fig. 3).



**Figure 3** - Comparison of cytokine productions between three infectious doses of CbC1 *C. burnetii* at different time point post challenge. The cytokine concentration was measured by ELISA. Data were expressed by median and interquartile range of 6 mice/time point. (A) Higher level of IFN-g was observed in mice inoculated with  $10^5$  bacteria specially the 2<sup>nd</sup> week. (B) Over production of IL-10 was measured in mice inoculated  $10^7$  *Coxiella*.



**Figure 4** - Comparison of IFN-g production of different vaccination groups 5 weeks postchallenge. The cytokine concentration was measured by Bio-Plex cytokine assay with supernatant of stimulated splenocytes and normalized to cytokine levels of naive mice. The data presented in each group are the median and interquartile range of five mice.



**Figure 5** - Comparison of cytokine responses of different vaccination groups 5 weeks postchallenge. The cytokine concentration was measured by Bio-Plex cytokine assay with supernatant of stimulated splenocytes and normalized to cytokine levels of naive mice. The data presented in each group are the median and interquartile range of five mice.

**3.1 Inflammatory response and abortion** - The full length phase I LPS does not stimulate macrophages. Phase I *C. burnetii* can infect and grow within human dendritic cells that which usually serve to detect the presence of pathogens, without inducing the maturation or inflammatory cytokine production by these cells (Shannon et al., 2005). In contrast to phase I LPS, the truncated phase II LPS induces dramatic maturation and inflammatory cytokines production that which is aggravated by adjuvants in adjuvanted inactivated phase II vaccines. Mice vaccinated with such a vaccine, ChlamyvacFQ (Meriel Lyon France) produced 35 times more IFN- $\gamma$  than those vaccinated with the phase I vaccine Coxevac (CEVA Sante Animale Libourne France) as well as other inflammatory cytokines (Fig. 4 and 5).

But only phase I vaccine protects against a virulent challenge. The same results were obtained in goats. This so high level of inflammatory cytokines could explain why, in experimental conditions the goats vaccinated with the phase II Chlamyvac FQ vaccine aborted before the unvaccinated control goats (Arricau-Bouvery et al., 2005). Indeed inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , produced in response to infection at the maternal-fetal interface have been postulated to predispose to abortions (Bouakane et al., 2003; Buxton et al., 2002; McCafferty et al., 1994).

**4. CONCLUSION** - Numerous questions are still unresolved. The availability of several genome sequences and the development of genetic tools (Beare et al., 2009a) for functional analysis of virulence gene

would help to investigate the molecular mechanism of virulence of *C. burnetii*. They would also facilitate various global gene expression, as microarray, to explore the diversity of the strains (Seshadri and Samuel, 2005) and to obtain a better knowledge of Q fever in ruminants essential for the control of the disease.

## References

- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006, Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol* 6, 38.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005, Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A., 2001, Etude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par le cyanamide calcique. In: 8ème Rencontres Recherches Ruminants, Paris, pp. 153-156.
- Arricau Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003, Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433.
- Baca, O., Paretsky, D., 1983, Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol. Rev.* 47, 127-149.
- Beare, P.A., Howe, D., Cockrell, D.C., Omsland, A., Hansen, B., Heinzen, R.A., 2009a, Characterization of a *Coxiella burnetii* ftsZ mutant generated by HimarI transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 191, 1369-1381.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., 3rd, Porcella, S.F., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2009b, Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the Genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* 77, 642-656.
- Behymer, D., Biberstein, E., Riemann, H.P., Franti, C.E., Sawyer, M., Ruppner, R., Crenshaw, G., 1976, Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of immunity after vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 37, 631-634.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001, Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.* 148, 502-505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002, Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.* 85, 55-60.
- Bouakane, A., Benchaieb, I., Rodolakis, A., 2003, Abortive potency of *Chlamydomydia abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. *Infect Immun* 71, 7219-7222.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996, A dog-related outbreak of Q fever. *Clin. Infect. Dis.* 23, 753-755.
- Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedegera, S., Entrican, G., 2002, Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *J. Comp. Pathol.* 127, 133-141.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiery, R., Tylewska-Wierzbanska, S., 2009, Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol J Microbiol* 58, 9-13.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A., 2004, Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol.* 186, 7344-7352.
- Davis, G., Cox, H., 1938, A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals and filtration experiments. *Public Health Rep.* 53, 2259.
- Dusquesne, V., Rousset, E., Prigent, M., Gasnier, T., Bouzid, M., Champion, J.L., Rodolakis, A., Thiery, R., 2007, Molecular typing of *Coxiella burnetii* from ruminant species by PCR-RFLP and sequencing of Cox 18 pseudogene. A preliminary study. In: Med-Vet-Net Annual meeting 2007 (Lucca Italy).
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005, *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1211-1217.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006, Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827-833.
- Guigno, D., Coupland, B., Smith, E.G., Farrell, I.D., Desselberger, U., Caul, E.O., 1992, Primary humoral antibody response to *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1958-1967.
- Hackstadt, T., 1986, Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect. Immun.* 52, 337-340.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E., 1999, Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 7, 149-154.

- Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Mallavia, L.P., 1991, Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.* 137, 269-276.
- Honstetter, A., Imbert, G., Ghigo, E., Gouriet, F., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L., 2003, Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. *J. Infect. Dis.* 187, 956-962.
- Hotta, A., Kawamura, M., To, H., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Amano, K., Hirai, K., 2003, Use of monoclonal antibodies to lipopolysaccharide for antigenic analysis of *Coxiella burnetii*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1747-1749.
- Jager, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998, Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol. Infect.* 120, 157-164.
- Kazar, J., 2005, *Coxiella burnetii* infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 105-114.
- Klaassen, C.H., Nabuurs-Franssen, M.H., Tilburg, J.J., Hamans, M.A., Horrevorts, A.M., 2009, Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 613-614.
- Komiyama, T., Sadamasu, K., Toriniwa, H., Kato, K., Arashima, Y., Fukushima, H., Hirai, K., Arakawa, Y., 2003, Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J. Infect. Chemother.* 9, 151-155.
- Langley, J.M., Marrie, T.J., Covert, A., Waag, D.M., Williams, J.C., 1988, *Pork players' pneumonia*. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N. Engl. J. Med.* 319, 354-356.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999, Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518-553.
- McCafferty, M.C., Maley, S.W., Entran, G., Buxton, D., 1994, The importance of interferon-gamma in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology* 81, 631-636.
- McCaul, T.F., Banerjee-Bhatnagar, N., Williams, J.C., 1991, Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect. Immun.* 59, 3243-3253.
- Moliner, C., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009, Evidence that the intra-amoebal *Legionella drancourtii* acquired a sterol reductase gene from eukaryotes. *BMC Res Notes* 2, 51.
- Moos, A., Hackstadt, T., 1987, Comparative virulence of intra- and inter-strain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect. Immun.* 55, 1144-1150.
- Nguyen, S.V., Hirai, K., 1999, Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 249-254.
- Plommet, M., Capponi, M., Gestin, J., Renoux, G., 1973, *Fièvre Q expérimentale des bovins*. *Annales Recherche Veterinaire* 4, 325-346.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N., 2007a, Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J. Dairy Sci.* 90, 5352-5360.
- Rodolakis, A., Bouzid, M., Souriau, A., Camuset, P., Berri, M., 2007b, Is the *Coxiella burnetii* Nine Mile strain a suitable antigen for detection of Q fever antibodies of ruminants by ELISA? In: *Preparing for the Animal Health challenges of the future - 13th international world association of veterinary laboratory diagnosticians symposium*, Melbourne Australia, p. 190.
- Rousset, E., Durand, B., Berri, M., Dufour, P., Prigent, M., Russo, P., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., Aubert, M., 2007, Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.* 124, 286-297.
- Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Poels, M.W., Shive, H.R., Weeks, B.R., Zhang, G.Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., McMurray, D.N., Samuel, J.E., 2009, *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.*
- Samuel, J.E., Frazier, M.E., Mallavia, L.P., 1985, Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 49, 775-779.
- Samuel, J.E., Kiss, K., Varghees, S., 2003, Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 653-663.
- Sanchez, J., Souriau, A., Buendia, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martinez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A., 2006, Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.* 135, 108-115.
- Scott, G.H., Williams, J.C., 1990, Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 291-296.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F., 2003, Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5455-5460.
- Seshadri, R., Samuel, J., 2005, Genome analysis of *Coxiella burnetii* species: insights into pathogenesis and evolution and implications for biodefense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 442-450.
- Shannon, J.G., Heinzen, R.A., 2008, Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *Immunol. Res.*
- Shannon, J.G., Howe, D., Heinzen, R.A., 2005, Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8722-8727.
- Sidwell, R.W., Gebhardt, L.P., 1966, Studies of latent Q fever infections. 3. Effects of parturition upon latently infected guinea pigs and white mice. *Am. J. Epidemiol.* 84, 132-137.
- Sidwell, R.W., Thorpe, B.D., Gebhardt, L.P., 1964a, Studies of Latent Q Fever Infections. II. Effects of Multiple Cortisone Injections. *Am. J. Hyg.* 79, 320-327.
- Sidwell, R.W., Thorpe, B.D., Gebhardt, L.P., 1964b, Studies on Latent Q Fever Infections. I. Effects of Whole Body X-Irradiation Upon Latently Infected Guinea Pigs, White Mice and Deer Mice. *Am. J. Hyg.* 79, 113-124.
- Stein, A., Raoult, D., 1993, Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb. Pathog.* 15, 177-185.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006, Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 268-274.
- Thiele, D., Willems, H., 1994, Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? *Eur. J. Epidemiol.* 10, 427-434.
- Tigert, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., 1961, Airborne Q fever. *Bacteriol. Rev.* 25, 285-293.
- To, H., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 1998a, Antigenic characteristic of the lipopolysaccharides of *Coxiella burnetii* isolates. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 267-270.
- To, H., Hotta, A., Zhang, G.Q., Nguyen, S.V., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Amano, K., Hirai, K., 1998b, Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. *Microbiol. Immunol.* 42, 81-85.
- To, H., Htwe, K.K., Yamasaki, N., Zhang, G.Q., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 1995, Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol. Immunol.* 39, 663-671.
- Toman, R., Skultety, L., 1996, Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. *Carbohydr. Res.* 283, 175-185.
- Voth, D.E., Heinzen, R.A., 2007, Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol.* 9, 829-840.
- Waag, D.M., 2007, *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. *Vaccine* 25, 7288-7295.
- Williams, J.C., 1991, Infectivity, virulence, and pathogenicity of *Coxiella burnetii* for various hosts. In: Williams, J.C., Thompson, H.A. (Eds.) *Q fever: the biology of Coxiella burnetii*. CRC Press, Boca Raton Florida, pp. 21 - 71.
- Zhang, G., Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Zhang, Y., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., 2007, Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. *J. Immunol.* 179, 8372-8380.
- Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 1997, Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol. Immunol.* 41, 871-877.



## Febbre Q: aspetti epidemiologici in Italia



M. FABBI

Sezione Diagnostica di Pavia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

*Coxiella burnetii* è l'agente eziologico della Febbre Q, una zoonosi batterica descritta per la prima volta come causa di infezione nel personale dei macelli in Australia negli anni '30<sup>1</sup> e in seguito riconosciuta in molti Paesi, tra cui l'Italia, dove le prime segnalazioni risalgono al 1944-45<sup>2</sup>. La Febbre Q è salita prepotentemente alla ribalta internazionale a seguito della recentissima epidemia occorsa in Olanda tra il 2007 e il 2009, anni in cui si sono registrati migliaia di casi di malattia nell'uomo e parallelamente una grande diffusione dell'infezione tra diversi allevamenti caprini di quel Paese.

Anche in Italia sono stati segnalati, anche abbastanza recentemente, alcuni casi di malattia nell'uomo sia a carattere epidemico che sporadico verificatisi in seguito a contatto sia diretto sia indiretto con ruminanti infetti (pecore e bovini) o loro prodotti<sup>3,4</sup>.

Diversi Autori hanno dimostrato nel nostro Paese la presenza e l'importanza dell'infezione in diverse specie di ruminanti<sup>5,6</sup>. Di rilievo altresì l'associazione di questa infezione anche all'aborto nel bufalo in Campania<sup>7</sup>.

È noto che gli animali infetti possono eliminare *C. burnetii* nell'ambiente tramite diversi escreti quali feci, urine, secreto vaginale, liquido amniotico e secreti quali latte e colostro e recentemente è stata riportata anche l'escrezione di *Coxiella burnetii* in corso di mastite bovina in forma subclinica. Anche se la via alimentare attraverso il latte e i suoi derivati è ritenuta di scarso rilievo epidemiologico, alcuni dati di prevalenza sulla presenza di *Coxiella burnetii* nel latte crudo pone interrogativi di sanità pubblica alla luce anche del diffondersi sia del consumo diretto di latte crudo non trattato termicamente sia della produzione di formaggi pure con latte crudo non pastorizzato.

Negli ultimi anni presso alcuni laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna è stata intensificata la sorveglianza verso l'infezione da *Coxiella burnetii* nei ruminanti ed in particolare nel bovino anche per la maggior vocazione territoriale all'allevamento di questa specie rispetto ad altre aree del centro-sud Italia nelle quali è maggiormente diffuso l'allevamento ovi-caprino.

In particolare è stata condotta una indagine sul latte di massa con tecnica PCR per valutare la diffusione di *Coxiella burnetii* negli allevamenti di alcune province della Lombardia (Pavia, Cremona, Mantova, Lodi). Inoltre l'esame diretto ed indiretto verso *Coxiella burnetii* è stato inserito di routine nelle indagini legate a problemi riproduttivi dei ruminanti (bovini, ovini e caprini) quali aborto ed infertilità. Vengono riferiti anche i risultati di una indagine condotta in Piemonte sul latte crudo alla distribuzione e campionato presso i distributori automatici a disposizione dei cittadini<sup>9</sup>.

*Coxiella burnetii* è stata dimostrata nel 5% dei casi in fenomeni di aborto ed infertilità nel bovino, nel 9,5% negli ovi-caprini. L'11% dei campioni legati a forme respiratorie atipiche del bovino è risultato positi-

vodato da valutare con cautela in quanto il numero dei campioni non appare sufficientemente significativo trattandosi di una casistica limitata a 35 campioni. Per quanto attiene ai risultati sul latte questi mostrano valori di prevalenza di *Coxiella burnetii* intorno al 40% a seconda delle province considerate<sup>8,10</sup>. Lo stesso dato emerge dalla regione Piemonte per il latte crudo campionato in fase di distribuzione<sup>9</sup>. Alla luce di questi risultati, oltre al ruolo patogeno noto per gli ovi-caprini, rimane da indagare meglio il ruolo patogeno del batterio nei bovini ed in particolare nei riguardi dell'uomo; a fronte infatti di una prevalenza così elevata nei nostri allevamenti non sembra corrispondere una altrettanto patogenicità nell'uomo o per lo meno con sintomatologia clinica rilevabile. Anche se sono segnalati casi di Febbre Q nell'uomo collegati alla frequentazione e al contatto con allevamenti bovini, e noi stessi abbiamo potuto seguirne alcuni, ulteriori studi sulla possibile differente virulenza tra ceppi di *Coxiella burnetii* provenienti da diverse specie di ruminanti, così come ipotizzato per la recente epidemia in Olanda, potrebbero fornire ulteriori chiarimenti in merito.

## Bibliografia

1. Derrick E.H. (1937) "Q" fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust*, 2: 281-299.
2. Caporale G., Mirri A., Rosati T. (1953) La Febbre "Q" quale zoonosi. *Atti Soc Ital Sci Vet*, 7: 13-96.
- 3) Manfredi Selvaggi, et.al. Investigation of a Q fever outbreak in Northern Italy. *Eur. J. Epidemiol.* (1996). 12: 403-408.
4. Starnini, et.al. (2005) An outbreak of Q fever in a prison in Italy. *Epidemiol. Infect.* 113. 377-380.
5. Masala G., et. al. (2004) Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy *Vet. Microbiol.* 99: 301-305.
6. Capuano et. al. (2004) *Coxiella burnetii*: quale realtà? *Parassitologia*, 46: 131-134.
7. Perugini, et.al. (2009) Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Research in Veterinary Science* 87 (2009) 189-191.
8. "Rilevamento di *Coxiella burnetii* nel latte di massa di alcune aziende bovine lombarde" (2009). S. Magnino, N. Vicari, M. Boldini, C. Rosignoli, A. Nigrelli, G. Andreoli, M. Pajoro, M. Fabbì. *Large Animal Review* 2009; 15: 3-6.
9. Decastelli L. (2010) IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta. Comunicazione Personale. Dati non pubblicati.
10. Bertasi, et al. (2008) Presenza di *Coxiella burnetii* e *Mycobacterium paratuberculosis* nel latte crudo: monitoraggio mediante tecniche di biologia molecolare. *Atti X Congresso Nazionale S.I.D.I.L.V.* Alghero, p. 103-104.





*Finito di stampare  
nel mese di Settembre 2010  
dalla Press Point srl  
di Abbiategrasso (Milano)*







Un unico dosaggio contro i nematodi gastrointestinali, polmonari, l'estro e gli acari responsabili delle rogne degli ovini.



**IVOMEC® Ovini**  
(ivermectina)

*I migliori prodotti per i migliori risultati™*



Merial Italia spa - Centro Direzionale Milanofiori - Strada 6, Palazzo E/5 - 20090 Assago (MI)  
Tel. 02.57.76.61 - Fax 02.57.766.301 - E-mail: [merial.italia@merial.com](mailto:merial.italia@merial.com) - [www.merial.com](http://www.merial.com)

® IVOMEC e il simbolo grafico "testa-ovino" sono marchi depositati di Merial. © Copyright 2002. Tutti i diritti riservati.